

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. R. Siegert

**UNTERSUCHUNGEN
ÜBER DIE TEMPERATURABHÄNGIGKEIT
DER WIRKUNG ANTIBAKTERIELLER CHEMOTHERAPEUTIKA
IN VITRO**

Inaugural-Dissertation
Zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
des Fachbereiches Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
Werner Frassine
aus Trautenau

Marburg 1976

Dissertationsdruck

Blasaditsch GmbH • 89 Augsburg 17 • Theodor-Heuß-Platz 3 • Telefon (0821) 51 85 63

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Marburg

Direktor: Prof. Dr. med. R. Siegert

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE TEMPERATURABHÄNGIGKEIT
DER WIRKUNG ANTIBAKTERIELLER CHEMOTHERAPEUTIKA
IN VITRO

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
des Fachbereiches Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
Werner Frassine
aus Trautenau

Marburg 1976



Angenommen von dem Fachbereich Humanmedizin der
Universität Marburg am: 11.5.76

gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan : Prof. Dr. G. Oepen
Referent : Prof. Dr. W. Mannheim
Korreferent: Prof. Dr. R. Siegert

Inhaltsübersicht

	Seite
A <u>Einführung und Problemstellung</u>	1
B <u>Material und Methoden</u>	5
- Überblick	5
a Mikroorganismen	5
b Nährmedien	6
c Hemmstoffe	6
d Inkubator	6
d' Verwendeter Temperaturgradient	7
e Turbidimetrie	9
f Versuchsansätze und Versuchsdurchführung	9
C <u>Ergebnisse</u>	13
a Einfluß verschiedener Hemmstoffkonzentrationen auf die turbidimetrische Wachstumskurve bei verschiedenen Brutungstemperaturen	13
b Ermittlung der für das Wachstum spezifischen Größen: Wachstumsrate und Wachstumsertrag	14
ba Bestimmung der Wachstumsraten bei den Versuchen mit Chloramphenicol und Sulfamethoxydiazin	14
bb Bestimmung der Wachstumserträge bei dem Versuch mit Ampicillin	15

	Seite
c Einfluß der Temperatur auf Wachstums- rate beziehungsweise Wachstumsertrag in Gegenwart von Chloramphenicol, Sulfamethoxydiazin und Ampicillin	15
d Temperaturabhängigkeit der HK 50 %-Werte, 17. die ein Maß für den Wirkeffekt sind	17
e Gegenüberstellung der 1/HK 50 %-Werte und der Wachstumsgrößen: Wachstumsraten beziehungsweise Wachstumserträge	19
D <u>Diskussion</u>	20
a Zur Methodik	20
aa Darstellung und Betrachtungen über die Methodik früherer Arbeiten mit ähnlicher Thematik	20
ab Kritische Betrachtung des eigenen methodischen Vorgehens	26
ac Bemerkungen zur Auswertung	30
b Zu den Ergebnissen	32
c Zur Klinik	36
E Zusammenfassung	39
F Tabellen	41
G Abbildungen	45
H Literatur	64

A Einführung und Problemstellung

Die Wirkungsgröße antibakterieller Substanzen ist neben der grundsätzlichen Empfindlichkeit eines Keimes gegenüber einem Wirkstoff von einer Anzahl chemischer und physikalischer Faktoren abhängig. Der Einfluß der Temperatur in dieser Beziehung wurde schon sehr früh erkannt. So finden sich schon bei KOCH (1881) Angaben über die Wirkungssteigerung von Phenol bei höheren Temperaturen (zitiert nach JOHNSON et al. (1954)). BEHRING (1890) beschrieb ein gegensätzliches Verhalten des Temperatureffektes auf die Entwicklungshemmung (Bakteriostase) und auf die Abtötung (Bakterizidie). Zu dem Problem des Temperatureinflusses auf die Desinfektionswirkung von Antiseptica sei hier nur am Rande auf zusammenfassende Angaben bei JOHNSON et al. (1954) und CHRISTOPHERSON (1955) und die dort zitierten Arbeiten verwiesen.

Nach der Entdeckung der Sulfonamide, des Penicillins und weiterer antibakterieller Chemotherapeutika fanden sich bei der näheren Erforschung dieser Substanzen auch hier Hinweise für eine unterschiedliche Wirkintensität bei verschiedenen Temperaturen. Bei Sulfonamiden beschrieben WHITE, PARKER (1938) und WHITE (1939) eine Wirkungszunahme mit dem Temperaturanstieg bei Temperaturen über 37°C beziehungsweise 35°C, während sich die

Wirkintensität im Bereich zwischen 30°C bis 35°C nur wenig ändert. Diese Angaben decken sich mit Ergebnissen von RANTZ, KIRBY (1944) und ESELTINE, RAHN (1949), die ein Wirkungsminimum bei 30°C bis 35°C beziehungsweise bei 7 - 10 Grad unter der optimalen Wachstumstemperatur und eine Zunahme der Wirkung im Temperaturbereich darüber und darunter beschreiben. Ähnliche Angaben finden sich auch schon bei LEE et al. (1943).

Für die Penicillinwirkung fanden HOBBY, DAWSON (1944) ganz allgemein: "Bedingungen, die die Wachstumsrate erhöhen, vergrößern auch die Wirkungsrate des Penicillins; Bedingungen, die die Wachstumsrate verringern, verkleinern auch die Wirkungsrate des Penicillins. Penicillin ist am effektivsten bei aktiver Vermehrung". Zu ähnlichen Ergebnissen kamen LEE et al. (1944). EAGLE, MUSSELMANN (1944) berichten, "daß die Abtötungsrate des Penicillins mit der Temperatur in einem Bereich zwischen 8°C bis 40°C zunahm. Weitere vergleichbare Ergebnisse finden sich bei HOBBY et al. (1942), BIGGER (1944), HOYT et al. (1945), COOPER, GILLESPIE (1952), FOLEY (1945) - letztere mit der Besonderheit, daß die Wirkungszunahme auch über die optimale Wachstumstemperatur hinaus weiterbesteht, obwohl die Kontrollkulturen langsamer wachsen -, weiterhin KLUDAS, STÖSS (1954) sowie KNOTHE, BUTENBERG (1955), die den größten Penicillineffekt bei der Temperatur mit der größten Stoffwechselaktivität (manometrische Messung der O₂ Verbrauchskurve mit Warburg Apparat) angeben. Einen variierenden Befund ergaben die Untersuchungen von KNOX, COLLARD (1952) an einem Penicillinasebildenden Bacillus cereus-Stamm. Diese Organismen zeigen

bei 37° C eine hohe Toleranz gegenüber Penicillin, während bei höheren Temperaturen (42°C) die Empfindlichkeit um über das 100-fache zunimmt. Das wird zurückgeführt auf das gegenüber dem Wachstumsoptimum niedrigere Temperaturoptimum für die adaptive Penicillinasebildung, die bei der höheren Temperatur nicht mehr zum Tragen kommt.

Über weitere Antibiotika finden sich in der Literatur nur wenig Angaben. Für Aureomycin und Streptomycin sowie zwei weitere Substanzen beschreibt BÖNIGKE (1951/1952) ein Wirkungsminimum bei optimaler Wachstumstemperatur für den Testkeim. KNOTHE, BUTENBERG (1955) haben neben Penicillin noch Streptomycin, Chloromycetin und Terramycin untersucht, für deren Wirkung sie nur geringe Temperaturabhängigkeit angeben. KLEIN (1953) beschreibt verschiedenes Verhalten bei bakteriostatischen und baktericiden Konzentrationen von Terramycin auch in Bezug auf die Temperatur und schließt daher auf verschiedene Wirkmechanismen.

In neuerer Zeit scheint der Temperaturfaktor bei der Chemotherapie mit antimykobakteriellen Substanzen eine gewisse Beachtung zu finden, wie verschiedene Veröffentlichungen zeigen (siehe dazu: MARKS (1951), KNOX et al. (1952), ARRIAGADA (1952), GEURDEN (1970), MAEKAWA et al. (1971)).

Im Vergleich all dieser Veröffentlichungen kann man zusammenfassend feststellen, daß sich die meisten Arbeiten in der Aussage über die Tendenz der Wirkungsänderung bei geänderter Temperatur einigermaßen zur Deckung bringen lassen. Bestehende Unterschiede, die vor allem bei den quantitativen Angaben stark auffallen, sind hauptsächlich in der Vielfalt der angewendeten Methoden begründet. So werden oft nur wenige

Bebrütungstemperaturen, die recht willkürlich festgelegt erscheinen, und verschieden lange Bebrütungszeiten angewendet. Außerdem sind die Erfolgsbestimmungen, ob und wie weit Wachstum eintrat, so unterschiedlich, daß ein quantitativer Vergleich unmöglich erscheint. Durch oft recht punkthafte Messungen werden meist nur Zustände nach verschieden langer Bebrütungsdauer festgehalten, die die Dynamik des Wachstums- und des Hemmvorganges nicht genügend erfassen.

Die Bedeutung der Zusammenhänge zwischen Temperatur und Hemmwirkung der Chemotherapeutika erscheinen für die Klinik aber nicht unwesentlich. Untersuchungen hierüber liegen zwar aus der Frühzeit der antibakteriellen Chemotherapie vor (WHITE, PARKER (1938), EAGLE, MUSSELMAN (1944), HOYT et al. (1945), EAGLE et al. (1947), LAPORTE et al. (1950), MARKS (1951), KNOX, COLLARD (1952), KLUDAS, STÖSS (1954), KNOTHE, BUTENBERG (1955) - und aus der Klinik: BALLENGER et al. (1937), LAMPERT (1949), MUGGENTHALER (1950), BERGER (1952), sie sind jedoch in neuerer Zeit weitgehend vernachlässigt worden. Mit der vorliegenden Arbeit soll nun versucht werden, mit einer verbesserten Methodik, die echte Wachstumsgrößen festzuhalten erlaubt, die Temperaturabhängigkeit der Wirkung antibakterieller Chemotherapeutika zu erfassen.

B Material und Methoden

Überblick

Um gemäß der obengenannten Fragestellung Aussagen über die Hemmstoffwirkung bei verschiedenen Temperaturen machen zu können, wurden 5 Reihen von je 18 Röhrchen als stehende Kulturen mit jeweils identischen Kulturansätzen (1. Reihe: kein Hemmstoff (als Bezugskultur), 2. - 5. Reihe: jeweils steigende Hemmstoffkonzentration) angefertigt. Diese wurden in einem Temperaturgradienten-Inkubator, der es ermöglicht, jeweils 5 Röhrchenkulturen bei 18 verschiedenen Temperaturen aufzunehmen, bebrütet. Das Wachstumsverhalten der Kulturen wurde durch Trübungsmessung registriert. Die sich hieraus für jede Röhrchenkultur ergebenden Wachstumskurven wurden bei der Auswertung in ihren charakteristischen Teilen miteinander verglichen und in Beziehung zueinander gesetzt.

a Mikroorganismen

Als Testkeim wurde Escherichia coli NCTC 9001 mit einer optimalen Wachstumstemperatur von 41°C , und in einem Parallelversuch Enterobacter carotovorus 1008 CCM (15713 ATCC) mit einem Wachstumsoptimum bei $33,75^{\circ}\text{C}$ verwendet. Beide wachsen in

flüssigen Medien mit diffuser Trübung und haben auch in Anwesenheit der benutzten Antibiotika eine gute Suspensionsstabilität. Sie weisen günstige Stoffwechselleistungen auf, die erlauben, NH_4 als N-Quelle zu verwerten und fakultativ anaerob zu wachsen. Im orientierenden Resistenztest erwiesen sie sich gegen die hier angewendeten antibakteriellen Substanzen als gut empfindlich.

b Nährmedien

Als Kulturmedien dienten Trypticase-Soy-Broth (Baltimore Biological Laboratory Inc. Cockeysville/Maryland, U S A) und bei Versuchen mit Sulfonamiden die P-Aminobenzoessäure-freie Mueller Hinton Broth (Difco Laboratories, Detroit/Michigan, U S A).

c Hemmstoffe

Als Hemmstoffe wurden Ampicillin (Bayer), Sulfamethoxydiazin (Bayer) und Chloramphenicol (Bayer) (Farbenfabriken Bayer AG/Leverkusen, BRD) verwendet. Es sind dies drei bekannte Substanzen mit verschiedenen Wirkungsmechanismen.

d Inkubator

Der bei den Versuchen benutzte Temperaturgradienten-Inkubator - eine Modifikation des von ELLIOTT (1963) beschriebenen Gerätes - wurde vordem schon von MANNHEIM, WOLF (1972) und SIMON (1972) verwendet und diskutiert. Er besteht aus einem im Winkel von 45° aufgestellten quaderförmigen Aluminiumblock (120 x 20 x 11 cm), der an seiner Oberseite 18 parallel gestellte Querreihen von je 5 Bohrungen (ϕ : 13 mm,

Tiefe: 75 mm, Abstand zwischen je zwei Lochreihen 29 mm) zur Aufnahme von Kulturröhrchen aufweist. An der Oberfläche ist er gegen Wärmeaustausch isoliert. Der Metallblock kann am oberen Ende auf eine einstellbare, konstante Temperatur angewärmt und am unteren Ende auf eine einstellbare, konstante Temperatur abgekühlt werden (Lauda-Ultra-Thermostat, Typenreihe U 3 Elektronik und Lauda-Klein-Kältethermostat, K 2 R Elektronik von Lauda Dr. R. Wobser KG Lauda, BRD).

Hierdurch entsteht in dem Metallblock durch Wärmeleitung ein Temperaturgefälle, das einem nahezu ideal linear verlaufenden Temperaturgradienten entspricht (maximale Abweichung $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ (MANNHEIM, WOLF 1972)).

Zur Einstellung des Temperaturgradienten wurde die Anwärme- und Kühltemperatur so lange verändert, bis in wassergefüllten Kulturröhrchen befindliche Quecksilberthermometer die gewünschten Temperaturen an den verschiedenen Positionen des Inkubators anzeigten. Während des Versuchsablaufes kann die Konstanz der Temperaturen durch sechs am Metallblock angebrachte Widerstandsthermometer, die mit einem Mehrpunktschreiber verbunden sind, kontrolliert werden (Widerstandsthermometer Typ TWE 3 und Schreiber Arucomp 4100, Hartmann & Braun AG, Frankfurt/Main, BRD).

d' Verwendeter Temperaturgradient

Die für die Versuche maßgebenden Temperaturgradienten reichten bei 18 Positionen von $15,25^{\circ}\text{C}$ bis $46,70^{\circ}\text{C}$, beziehungsweise bei dem Versuch mit

Enterobacter carotovorus von 9,70°C bis 41,15°C, wobei der Temperaturunterschied zwischen zwei benachbarten Positionen jeweils 1,85°C betrug. (Abb.1) Es ergeben sich daraus folgende Bebrütungstemperaturen:

Position: Bebrütungstemperaturen (° C)
(bei Versuch I-III) (bei Versuch IV)

1	15,25 °	9,70 °
2	17,10 °	11,55 °
3	18,95 °	13,40 °
4	20,80 °	15,25 °
5	22,65 °	17,10 °
6	24,50 °	18,95 °
7	26,35 °	20,80 °
8	28,20 °	22,65 °
9	30,05 °	24,50 °
10	31,90 °	26,35 °
11	33,75 °	28,20 °
12	35,60 °	30,05 °
13	37,45 °	31,90 °
14	39,30 °	33,75 °
15	41,15 °	35,60 °
16	43,00 °	37,45 °
17	44,85 °	39,30 °
18	46,70 °	41,15 °

e Turbidimetrie

Der Wachstumserfolg der Kulturen wurde durch Trübungsmessung bestimmt. Hierzu wurden die Kulturröhrchen - sie wurden vorher auf gleiche Lichtdurchlässigkeit geprüft und markiert - zu den festgesetzten Zeiten in gleichbleibender Reihenfolge vorübergehend aus dem Temperaturgradienten-Inkubator genommen, mittels eines Vibrationsmischers (Super Mixer Cat. Nr. 1291, LAB-LINE Instruments. Inc., Melrose Park, III. U S A) aufgeschüttelt und die Transmission in einem speziellen Küvettenhalter (Nr. 115 320) an einem "Eppendorf"-Photometer (Netheler & Hinz GmbH, Hamburg, BRD) bei rotem Licht von 578 nm Wellenlänge gemessen. Die Meßdaten wurden laufend mitgeschrieben (Kompensationsschreiber 4412, Eppendorf Nr. 4412073 mit Transformationsstufe 1851 Eppendorf). Anhand einer Tabelle, die aus einer Standardkurve für die Beziehung Trockensubstanz der suspendierten Bakterienmasse zu Transmission für Escherichia coli erstellt ist (MANNHEIM 1964) (siehe dazu Abb. 2), wurden die erhaltenen Transmissionswerte in Bakterientrockensubstanz pro Volumen übertragen.

f Versuchsansätze und Versuchsdurchführung

Als Vorkultur wurde ein Klon des Keimes in das Nährmedium überimpft und bei 37°C inkubiert. Der Wachstumserfolg wurde turbidimetrisch gemessen; dann wurde bis zur gewünschten Einsaatdichte verdünnt. Parallel zum Hauptversuch wurde die Einsaat mikroskopisch sowie an Hand des Verhaltens im polytropen Medium nach KLIGLER, des Indolbindungsvermögens und der Beweglichkeitsprüfung auf ihre

Identität überprüft. Für den Versuchsansatz wurden unter sterilen Kautelen 6 bis 7 Portionen Nährmedium bereitgestellt, von denen 5 bis 6 steigende Konzentrationen Hemmstoff enthielten, während eine hemmstofffrei blieb. Die Hemmstoffkonzentrationen waren so gewählt, daß sie gemäß orientierender Vorversuche eine Hemmwirkung von 50 % einschließen sollten. Zu diesen Portionen wurden jeweils die gleichen Mengen (50 ml) Einsaatlösung gegeben. Von diesen Ansätzen wurden je 18 Kulturröhrchen mit 5 ml angefüllt und mit Metallkappen verschlossen. Die Kulturen wurden in derselben Reihenfolge, die später auch beim Messen eingehalten werden sollte, in den Temperaturgradienten-Inkubator zum Bebrüten gestellt, so daß jeweils ein Röhrchen von 5 Portionen bei einer der 18 verschiedenen Temperaturen inkubiert wurde.

Im einzelnen war die Zusammensetzung der Kulturen:

I. bei dem Versuch über die Hemmwirkung von Chloramphenicol auf Escherichia coli NCTC 9001:

Portionen	O	A	B	C	D	E
Röhrchen-Nr.	1-18	11-18	1-18	1-18	1-18	1-10
Hemmstoffkonzentration in $\mu\text{g/ml}$	0	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5
Einsaatmenge in $\mu\text{g/ml}$	1	1	1	1	1	1

II. bei dem Versuch über die Hemmwirkung von
Sulfamethoxydiazin auf Escherichia coli
NCTC 9001:

Portionen	O	A	B	C	D	E
Röhrchen-Nr.	1-18	1-3 u. 16-18	1-18	4-18	1-18	1-15
Hemmstoff- konzentration in $\mu\text{g/ml}$	0	1	2	4	6	8
Einsaatmenge in $\mu\text{g/ml}$	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001

III. bei dem Versuch über die Hemmwirkung von
Ampicillin auf Escherichia coli NCTC 9001:

Portionen	O	A	B	C	D	E	F
Röhrchen-Nr.	1-18	10-18	7-18	1-18	1-18	1-9	1-6
Hemmstoff- konzentration in $\mu\text{g/ml}$	0	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0
Einsaatmenge in $\mu\text{g/ml}$	1	1	1	1	1	1	1

IV. bei dem Versuch über die Hemmwirkung von
Chloramphenicol auf Enterobacter carotovorus
1008 CCM:

Portionen	O	A	B	C	D	E	F
Röhrchen-Nr.	1-18	11-18	7-18	1-18	1-18	1-10	1-6
Hemmstoff- konzentration in $\mu\text{g/ml}$	0	0,3	0,9	1,5	2,1	2,7	3,3
Einsaatmenge in $\mu\text{g/ml}$	1	1	1	1	1	1	1

Die Trübungsmessungen während des Wachstums wurden je nach Wachstumsgeschwindigkeit 1/2-stündlich, stündlich oder 2-stündlich durchgeführt. Dabei wurde in gleicher Reihenfolge gemessen, so daß für die einzelnen Kulturen der Zeitabstand jeweils eingehalten wurde. Das Wachstum der Kulturen wurde so mindestens 36 Stunden, längstens 72 Stunden lang verfolgt und registriert.

C Ergebnisse

a Einfluß verschiedener Hemmstoffkonzentrationen auf die turbidimetrische Wachstumskurve bei verschiedenen Bebrütungstemperaturen

Für jede Kultur wurde eine Wachstumskurve in der üblichen halblogarithmischen Auftragungsart angelegt (Ordinate: Bakterienmasse/Volumen; Abszisse: Zeit). Die Kurven für die fünf Kulturen, die bei gleicher Temperatur bebrütet wurden, sind jeweils zusammen abgebildet.

Die Abbildungen 3 bis 6 zeigen Beispiele solcher Kurven. Aus ihnen lassen sich die Verläufe der Wachstumskurven und deren verschiedene Charakteristik in Gegenwart verschiedener Hemmstoffe erkennen.

- Die turbidimetrische Wachstumskurve der hemmstofffreien Vergleichskulturen zeigt jeweils den schon von MONOD (1942) beschriebenen Verlauf, der die verschiedenen Wachstumsphasen erkennen läßt.

Bei den Kurven der mit Sulfamethoxydiazin gehemmten Kulturen (Abb. 4) läßt sich nach einiger Zeit ein Abbiegen der Kurven in einen

erneut geradlinigen aber je nach Hemmstoffkonzentration flacheren Verlauf feststellen. Dieser entspricht also einem exponentiellen Wachstum mit geringerer Wachstumsrate. Später gehen auch diese Kurven in den horizontalen Verlauf der stationären Phase über.

Ein ähnliches Bild zeigen die Kurven der mit Chloramphenicol gehemmten Kulturen (Abb. 3 und 6); nur daß hier die Hemmwirkung früher in Erscheinung tritt und daß sich manchmal mehrere immer flacher werdende gerade Strecken, in der die Kultur also exponentiell wächst, hintereinander finden.

Grundsätzlich anders verlaufen die Kurven der mit Ampicillin gehemmten Kulturen (Abb. 5). Sie biegen nach einiger Zeit ab, zeigen einen Gipfel und verlaufen dann wieder abwärts, wo sie sich nach einiger Zeit auf ein niedrigeres horizontales Niveau einstellen.

b Ermittlung der für das Wachstum spezifischen Größen: Wachstumsrate und Wachstumsertrag

ba Bestimmung der Wachstumsraten bei den Versuchen mit Chloramphenicol und Sulfamethoxydiazin

Aus den Wachstumskurven wurden im Bereich der exponentiellen Wachstumsphase die Verdoppelungszeiten abgelesen. Der gerade Verlauf der Kurve wurde dabei in einem Trübungsbereich zwischen den Transmissionswerten von 90 und 65 % (entsprechend 0,021 und 0,096 mg/ml Bakterienmasse/Volumen) berücksichtigt, da die verwendete turbidimetrische

Methode in diesem Bereich meßtechnisch die genauesten Ergebnisse erbringt (siehe Abb. 3, 4 und 6). Durch die in der exponentiellen Wachstumsphase geltende Beziehung $R_2 = \frac{1}{G}$, die zeigt, daß die Wachstumsrate in Bezug auf den Logarithmus der Basis 2 (R_2) dem Kehrwert der Verdoppelungszeit (G) entspricht (OBERZILL (1967) Seite 162), wurden die Wachstumsraten nach dieser Gleichung rechnerisch ermittelt. Sie sind in Tabelle I, II und IV festgehalten.

bb Bestimmung der Wachstumserträge bei dem Versuch mit Ampicillin

Hierzu wurden aus den Wachstumskurven die Größen der Bakterientrockensubstanz/Volumen direkt abgelesen und zwar bei den Bezugskurven (hemmstofffrei) bei Eintritt in die stationäre Phase und bei den Kurven der gehemmten Kulturen der höchste Ertrag, den die Kurven erreichen, bevor die Trübung wieder abnimmt. Zeitlich lag dieser Punkt jeweils vor dem Zeitpunkt, an dem die Kontrollkurve das Plateau der stationären Phase erreicht hatte (siehe Abb. 5). Die Werte sind in Tabelle III zusammengefaßt.

c Einfluß der Temperatur auf Wachstumsrate beziehungsweise Wachstumsertrag in Gegenwart von Chloramphenicol, Sulfamethoxydiazin und Ampicillin

Die Abbildungen 6 bis 9 zeigen die Wachstumsraten beziehungsweise Erträge (Ordinate) gegen die Temperatur (Abszisse) aufgetragen.

- Bei den hemmstofffreien Kulturen nehmen dabei die Kurven der Wachstumsraten (Abb. 7, 8 und 10) mit steigender Temperatur zunächst einen aufsteigenden Verlauf, der bei der optimalen Wachstumstemperatur einen Gipfel aufweist und danach mit Annäherung an die maximale Wachstumstemperatur relativ rasch abfällt. Bei den Kurven der gehemmten Kulturen fällt auf, daß sie nicht in gleicher Relation zur Kontrollkurve verlaufen. Daraus geht hervor, daß bei verschiedenen Temperaturen die relative Wirkgröße bei gleichen Hemmstoffkonzentrationen unterschiedlich ist. Als auffällig ist zu bemerken, daß sich die Gipfel des optimalen Wachstums bei diesen Kurven zu niedrigeren Temperaturen hin verschieben und dann schon rücklaufende Tendenz zeigen während die Kontrollkurve noch ansteigt, was in diesem Bereich einer Vergrößerung des Wirkeffektes entspricht.

Bei den Kurven der mit Ampicillin gehemmten Kulturen, bei denen Wachstumserträge aufgetragen wurden (Abb. 9), läßt sich für die hemmstofffreie Kultur zunächst feststellen, daß die Kurve auf viel höherem Niveau beginnt, nur ganz wenig zu einem Optimum ansteigt, das bei den Erträgen weniger ausgesprochen ist und in einem niedrigeren Temperaturbereich liegt als das Optimum bei den Wachstumsraten. Die Kurven der hemmstoffenthaltenden Kulturen zeigen entsprechend den Kurven, bei denen die Wachstumsraten aufgetragen wurden, verschieden große Wirkeffekte bei den verschiedenen Temperaturen und weisen gegenüber der Kontrollkurve deutliche Optima auf, die ebenfalls in etwas niedrigere Temperaturbereiche verschoben erscheinen.

d Temperaturabhängigkeit der HK 50 %-Werte, die ein Maß für den Wirkeffekt sind

Aus diesen für das Wachstum einer Kultur charakteristischen Daten wurde graphisch für jede Temperatur diejenige Hemmstoffkonzentration (HK 50 %) ermittelt, die eine 50 %-ige Hemmung bezogen auf die Wachstumsrate beziehungsweise auf den Ertrag ergibt. Hierfür wurden die Raten beziehungsweise Erträge (Ordinate) gegen die Hemmstoffkonzentration (Abszisse) aufgetragen. Aus diesen sigmoid verlaufenden Dosis-Wirkungskurven wurden bei der Hälfte des jeweiligen Wachstumsraten- beziehungsweise Ertragswertes der hemmstofffreien Vergleichskurven die entsprechende Konzentration mit 50 %-iger Wirkung abgelesen. Abbildung 11 zeigt beispielhaft einige dieser Kurven. Die so erhaltenen HK 50-Werte sind in den Tabellen I bis IV aufgeführt.

In Abbildung 12 bis 15 wurden die HK 50 %-Werte (Ordinate) gegen die Temperatur (Abszisse) aufgetragen.

- Diese Kurven, die nun indirekt die Größe des Wirkungseffektes bei den verschiedenen Temperaturen veranschaulichen, zeigen trotz einiger Verschiedenheiten im Prinzip ein ähnliches Bild. Sie weisen entlang des Temperaturgradienten einen ansteigenden, gipfelbildenden und wieder absinkenden Verlauf auf. Der Gipfel gibt den Temperaturbereich an, bei dem die für eine 50 %-ige Hemmung benötigte Hemmstoffkonzentration am größten, der Wirkeffekt somit am geringsten ist; anders ausgedrückt, daß in diesem Bereich die Kultur gegenüber dem Hemmstoff am widerstandsfähigsten ist. Er liegt jeweils

mehrere Grade unterhalb des Wachstumsoptimums und zwar im einzelnen: Für den Versuch I bei etwa 25° bis 32° C; für den Versuch II bei etwa 23° bis 35° C; für den Versuch III bei etwa 20° bis 30° C; bei dem Versuch IV von unter 10° bis etwa 15° C.

Der nach dem Gipfel absteigende Verlauf der Kurven, das heißt die Verkleinerung der HK 50 %-Werte mit steigender Temperatur zeigt, daß in diesem Bereich der Wirkeffekt mit der Temperatur zunimmt. Vor allem für den mesophilen Escherichia coli Stamm befindet sich dieser Temperaturbereich im Bereich der für den Menschen physiologischen Körpertemperatur und der Fiebertemperaturen.

Wenn man die HK 50 %-Werte für die Temperaturen 37°, 39° und 41° C abgreift, ergibt sich folgendes Bild:

		37°	39°	41°	
zum Versuch I (mit Chloramphenicol)	HK 50%	0,87	0,7	0,625	/ug/ml
zum Versuch II (mit Sulfa-methoxydiazin)	HK 50%	3,4	2,9	2,1	/ug/ml
zum Versuch III (mit Ampicillin)	HK 50%	1,0	0,8	0,7	/ug/ml

e Gegenüberstellung der $1/HK$ 50 %-Werte und der Wachstumsgrößen: Wachstumsraten beziehungsweise Wachstumserträge

In den Abbildungen 16 bis 19 wurden die Kurven der Reziprokwerte der HK 50 % (Ordinate) als Maß für den Wirkungseffekt gegen die Temperatur (Abszisse) den Kurven der Wachstumsraten beziehungsweise der Erträge (Ordinate) gegen die Temperatur (Abszisse) gegenübergestellt. Diese Darstellungsart zeitigt gegenüber der vorigen zwar kein prinzipiell neues Ergebnis; da $1/HK$ 50 % aber als direktes Maß für die Größe des Wirkeffektes angesehen werden kann, veranschaulicht sie das Verhalten gerade dieser untersuchten Größe besser.

- Auch hier zeigen sich, wie schon oben beschrieben, die Bereiche mit dem kleinsten Wirkeffekt mehrere Grade unterhalb der optimalen Wachstumstemperatur mit einer deutlichen Erhöhung des Wirkeffektes mit steigender Temperatur oberhalb dieser Bereiche.

D Diskussion

a Zur Methodik

aa Darstellung und Betrachtungen über die Methodik früherer Arbeiten mit ähnlicher Thematik

Bei den bestehenden Arbeiten, die die Temperaturabhängigkeit der Wirkung von antibiotischen Substanzen behandeln (siehe dazu: WHITE (1939), HOBBY et al. (1942), LEE et al. (1943), HOBBY, DAWSON (1944), EAGLE, MUSSELMAN (1944), LEE et al. (1944), RANTZ, KIRBY (1944), HOYT et al. (1945), LEE, FOLEY (1945), ESELTINE, RAHN (1949), MARKS (1951), BÖNICKE (1951/52), ARRIAGADA (1952), COOPER, GILLESPIE (1952), KNOX, COLLARD (1952), KNOX et al. (1952), KLEIN (1953), KLUDAS, STÖSS (1954), FASSIN et al. (1955), KNOTHE, BUTENBERG (1955), WINKLER (1962), GARRETT (1966), MUSCHEL et al. (1969), GEURDEN (1970), MAEKAWA (1971)), finden sich meist nur schwer vergleichbare und lückenhafte Angaben. Dies ist, wie schon anfangs erwähnt, vor allem auf das unterschiedliche methodische Vorgehen bei den Untersuchungen zurückzuführen. So werden verschiedene Kulturmethoden mit unterschiedlicher Art der Einsaat und des Ansatzes angewendet, die oft auch innerhalb einer Versuchsreihe wohl nicht ganz

gleich zu halten sind, es werden vielfach nur wenige punkthafte Bebrütungstemperaturen ausgetestet, die Bebrütungsdauer und die Meßintervalle sind verschieden lang und vor allem ist auch die Erfolgsmessung sehr unterschiedlich. Dabei kommen die Lebendkeimzählung, die Gesamtkeimzählung, die manometrische Messung von Atmungsgrößen, das Reihenverdünnungsverfahren bei Kulturen in flüssigen und auf festen Nährböden mit makroskopischer Trübungsmessung, die photometrische Trübungsmessung, die Messung von Hemmhöfen beziehungsweise Hemmzonen und Tierversuche zur Anwendung. Um diese Vielfalt zu veranschaulichen, wurden die entsprechenden Arbeiten auf vier Gesichtspunkte des methodischen Vorgehens hin untersucht. Die hierbei gefundenen Angaben sind im folgenden tabellarisch aufgeführt und gegenübergestellt. Die vier angegebenen Kriterien sind: Kulturmethode; Art der Erfolgsmessung; Anzahl der verschiedenen Bebrütungstemperaturen, bei denen die Versuche durchgeführt wurden; Häufigkeit beziehungsweise Zeitabstände der Erfolgsmessung.

Übersicht über vier ausgesuchte Kriterien des methodischen Vorgehens bei verschiedenen Autoren, die Angaben über die Temperaturabhängigkeit von antibakteriellen Substanzen machen.

	<u>Kultur-</u> <u>methoden:</u>	<u>Erfolgs-</u> <u>messung:</u>	<u>Tempe-</u> <u>ratur-</u> <u>stufen:</u>	<u>Anzahl</u> <u>der</u> <u>Messungen:</u>
WHITE (1939)	Bouillonk.	Reihenverd.	9	2 mal
HOBBY et al. (1942)	Bouillonk. stehend	Keimzählung	3	4 mal

	<u>Kultur- methoden:</u>	<u>Erfolgs- messung:</u>	<u>Tempe- ratur- stufen:</u>	<u>Anzahl der Messungen:</u>
HOBBY, DAWSON (1944)	Bouillonk. stehend	Keimzählung	2	5 mal
EAGLE, MUSSELMAN (1944)	Bouillonk. stehend	Keimzählung mikrosk.	5	5-8 mal (mehrstdl.)
RANTZ, KIRBY (1944)	Bouillonk.	Trübungsm. photometr.	8	einige male
HOYT et al. (1945)	Bouillonk. stehend	Trübungsm. photometr.	3	2 mal
LEE, FOLEY (1945)	Bouillonk.	Lebendkeim- zählung	3	6 mal 3 mal 2 mal
ESELTINE, RAHN (1949)	Bouillonk.	Reihenverd. makrosk.	5	(Tage)
ARRIAGADA (1952)	Tiervers.	Infektion d. Tieres	7	1 mal
COOPER, GILLESPIE (1952)	Agardiff. in Röhrchen	Hemmzonen- messung	5	1 mal
KNOX, COLLARD (1952)	Bouillonk. stehend	Trübungsm. makrosk.	4	1 mal
KLEIN (1953)	Bouillonk.	Atmungsm.	2	(1/2-stdl.)
KLUDAS, STÖSS (1954)	Agardiff. auf Platten	Hemmhof- messung	3	1 mal
	Agarkultur	Keimzählung	3	1 mal
	Reihenverd.			
FASSIN et al. (1955)	Bouillonk.	-Lebendkeimz. (Subkultur) -O ₂ -Messung	5	(stündl.)
KNOTHE, BUTENBERG (1955)	Bouillonk.	Atmungsm.	6	(20-min)

	<u>Kultur-</u> <u>methoden:</u>	<u>Erfolgs-</u> <u>messung:</u>	<u>Tempe-</u> <u>ratur-</u> <u>stufen:</u>	<u>Anzahl</u> <u>der</u> <u>Messungen:</u>
WINKLER (1962)	Agarkultur Reihenverd.	makrosk. ablesen	4	1 mal
GARRETT (1966)	Bouillonk. geschüttelt	Lebendkeimz. Keimzählung	10	(1/2-stdl.)
MUSCHEL et al.(1969)	Bouillonk.	Trübungsm. photometr.	3	1 mal
GEURDEN (1970)	Tiervers.	Infektion	4	1 mal
MAEKAWA et al.(1971)	Bouillonk.	?	3	?

Alle angeführten Autoren verwenden, wie sich zeigt, in der Bakteriologie weit verbreitete und allgemein bekannte Kulturmethoden und Erfolgsmessungsmethoden, so daß auf eine Diskussion im einzelnen verzichtet werden kann. Es sei hier auf einschlägige Lehr- und Handbücher sowie Monographien und die dort zitierten Arbeiten verwiesen (siehe dazu zum Beispiel: OBERZILL (1967), DAVIS et al. (1968), STARKA (1968), MALLETT (in NORRIS, RIBBONS (1969)) und andere). Lediglich der Papierplättchentest, ein Agardiffusionsverfahren, wie er unter anderen von ERICSSON et al. (1954) und in Nachfolgearbeiten (ERICSSON (1960), ERICSSON et al. (1960), ERICSSON (1962), KIRBY et al. (1963), ERICSSON (1967), ERICSSON, SHERRIS (1971)) und in vergleichbarer Weise auch sehr gut in OBERZILL (1967 Seite 323 ff.) und dort zitierten Arbeiten beschrieben ist, soll gesondert erwähnt werden, da es sich hierbei wohl um das am häufigsten angewendete Verfahren der Sensibilitätsprüfung handelt.

Nach der breit angelegten Studie von ERICSSON, SHERRIS (1971) wird dieser Agardiffusionstest weiterhin als hauptsächliches Verfahren zur routinemäßigen Empfindlichkeitstestung empfohlen, vor allem auch wegen seiner "Einfachheit, schnellen Durchführbarkeit, Flexibilität und Wirtschaftlichkeit" (ebenda Seite 78).

In der gleichen Arbeit, in der Bouillon-Reihenverdünnungsverfahren, Agar-Reihenverdünnungsverfahren und Agardiffusionstest vergleichend untersucht werden, wird festgestellt, daß bei den daraus erhaltenen Ergebnissen nur kleine Unterschiede zwischen den drei Techniken bestehen mit ein wenig geringeren Abweichungen bei der Diffusionsmethode (ebenda Seite 83). Dabei ist allerdings zu sagen, daß sich diese Untersuchungen vor allem auf die Reproduzierbarkeit der Methode in verschiedenen Laboratorien beziehen und daß dabei lediglich Hemmhofgrößen in Milimetern gemessen mit in Reihenverdünnungstesten bei Verdoppelungsschritten gefundenen minimalen Hemmkonzentrationen verglichen werden. Es ergeben sich daraus für die jeweiligen Versuche zwar eindeutige Regressionslinien (ERICSSON, SHERRIS (1971) Seite 54 ff. Abb. 5 - 8), die Streubreite der Meßpunkte ist jedoch sehr groß, wie diese Kurven zeigen, daß die minimale Hemmkonzentration um einige Zweierpotenzen verschieden gefunden werden kann. (Eine ähnliche Fehlerbreite solcher Meßpunkte findet sich auch bei WEWALKA et al. (1973)). Bei zum Vergleich herangezogenen Reihenverdünnungsverfahren finden sich Angaben über minimale Hemmstoffkonzentrationen, die um mehrere Verdünnungsschritte, also Zweierpotenzen verschieden sind (siehe dazu ebenda Seite 17 ff. Tabelle 5 - 7).

So kann also gesagt werden, daß die Papierblättchenmethode vor allem für Routineuntersuchungen eine sehr gut praktikable Methode ist, die auch in ihrer quantitativen Genauigkeit als richtungsgebend für die Therapie geeignet ist (ERICSSON et al. (1960) Seite 417), daß sie aber für die Hemmstoffanalytik im engeren Sinne doch zu ungenau erscheint. So hebt auch OBERZILL (1967) hervor, "daß aus dem Hemmzonenmeßwert einer einzigen Konzentrationsstufe, auch zum Beispiel eines bekannten Antibiotikums, nicht die hemmende Grenzkonzentration des unbekannten Keimes ermittelt werden kann und ebenso nur unter einschränkenden Voraussetzungen ein Vergleich der Wirksamkeit verschiedener Antibiotika aufgrund der Hemmzonen bei gleichen Testorganismen möglich ist" (ebenda Seite 355). Vor allem scheint die Angabe der an der Hemmhofgrenze aktuell bestehenden Hemmstoffkonzentration, die der minimalen Hemmkonzentration entspricht, sehr schwierig. ERICSSON et al. (1960) Seite 417, Abb. 1) geben zwar für den Durchmesser der Hemmzonen in Bezug zum $\log_2$ -Wert der minimalen Hemmkonzentrationen eine Regressionslinie an, der Weg, wie sie zu dieser Kurve kommen und vor allem die Fehlerbreite, erscheinen in der Arbeit jedoch ungenügend angegeben. Auch OBERZILL (1967) gibt in seinem Kapitel über Agardiffusion (ebenda Seite 323 ff.) "mathematische Modelle" zur Bestimmung des Konzentrationsgefälles an. Er weist jedoch gleichzeitig auf die Komplexität vor allem des Diffusionsvorganges mit zahlreichen Abhängigkeiten von physikalischen und chemischen Größen sowie vom Zeitfaktor hin. Ein weiterer wesentlicher Faktor, der die Hemmhofgröße

beeinfluß, sind die biologischen Größen der Kultur. In Bezug auf Versuche über Temperaturabhängigkeiten kämen somit gerade unter Verwendung verschiedener Temperaturen, mit deren Beeinflussung der Diffusion (siehe dazu auch COOPER, LINTON (1952)) und des Wachstumsverhaltens der Kultur, in ihren Auswirkungen schwer zu fassende veränderliche Größen hinzu, so daß eine Verwendung dieser Methode gerade bei solchen Untersuchungen auch schon deswegen ungeeignet erscheint.

ab Kritische Betrachtung des eigenen methodischen Vorgehens

Die in der vorliegenden Arbeit angewendete Methodik beruht im wesentlichen auf der Bebrütung stehender Bouillonkulturen im Temperaturgradienten-Inkubator als Kulturverfahren und der photomatriscen Trübungsmessung als Erfolgsmeßverfahren. Untersucht wurde das Verhalten der Kultur bei 18 verschiedenen Temperaturen, was Meßergebnisse in einem angemessenen großen Temperaturbereich mit ausreichend dicht gelegenen Meßpunkten ergibt. Die Erfolgsmessung wurde halbstündlich bis stündlich durchgeführt, wodurch genügend Messungen zur genauen Darstellung des Wachstumsverhaltens in Wachstumskurven vorlagen.

Das Kulturverfahren in stehenden Bouillonkulturen ist ein oft verwendetes und vor allem leicht zu handhabendes Verfahren. Von der Einfachheit der Durchführung her ist es in etwa den Methoden der Agarkulturen gleichzusetzen, die aber, wie schon oben ausgeführt, aus Gründen der ungenauen Ablesbarkeit nicht so günstig erscheinen. Andere Verfahren wie Schüttelkulturen oder kontinuierliche Kulturen sind demgegenüber wesentlich aufwendiger. Als Nachteil der stehenden

Kultur könnte gelten, daß das Wachstum mit zunehmender Dichte der Kultur beeinträchtigt wird und stationär wird. Bei geringer Bakteriendichte, die bei der Auswertung in der Regel berücksichtigt wurde, und in einem Bereich, wo während der exponentiellen Wachstumsphase die Wachstumsrate gleich bleibt, kann jedoch davon ausgegangen werden, daß diese Größe nur von den gleichbleibenden äußeren Wachstumsbedingungen wie Keimart, Zusammensetzung des Nährmediums und Temperatur abhängig ist und wenigstens in der frühen exponentiellen Phase nicht von den sich mit dem Wachstum ändernden Kulturbedingungen wie Nährstoffabnahme und Zunahme von Stoffwechselabfallprodukten. Diese kommen erst mit größerer Dichte der Kultur zum Tragen und bedingen das Abbiegen der Wachstumskurve in die stationäre Phase. So weisen zum Beispiel CHRISTOPHERSEN (1955) (Seite 188) STÁRKA (1968) (Seite 233) und auch OBERZILL (1967) (Seite 175) darauf hin, daß bei einer gegenüber einem reichlichen Nährstoffangebot geringen Keimzahl die Wachstumsgeschwindigkeit praktisch nicht merklich beeinflußt wird. Die Tatsache, daß stehende Kulturen verwendet werden, beeinträchtigt daher die Genauigkeit der Ergebnisse nicht wesentlich.

Der Temperaturgradienten-Inkubator ist für die stehenden Bouillonkulturen ein sehr gutes Bebrütungsgerät. Dieses Gerät mit anderen ähnlichen Inkubatoren vergleichende und beurteilende Angaben finden sich bei SIMON (1972). Es bietet die Möglichkeit fünf Reihen von sich in nur einer Bedingung - hier die verschiedene Hemmstoffkonzentration - unterscheidenden Kulturen mit jeweils identischen Ansätzen bei 18 verschiedenen entlang eines Gradienten gelegenen Temperaturen gleichzeitig zu bebrüten, wodurch das unterschiedliche Wachstumsverhalten vergleichbar wird. Über die große Bedeutung

gleicher Ausgangsbedingungen für die zu vergleichen-
den Kulturen siehe OBERZILL (1967).

Die Trübungsmessung von Kulturen am Photometer mit Übertragung der Meßgrößen in Bakterienzahl oder Bakterienmasse nach empirisch gefundenen Vergleichswerten ist eine bekannte Methode (vergleiche dazu MONOD (1942), JOSLYN (1944), CHRISTOPHERSEN (1955), MALLETT (1965), OBERZILL (1967) und die dort zitierten Arbeiten, STÄRKA (1968)). Sie erbringt als Verfahren der Wachstumserfolgsmessung genügend genaue Ergebnisse. So fanden zum Beispiel KOCH, KAPLAN (1964) eine hohe gesicherte Korrelation zwischen Keimzahl und Extinktion. Für die in der vorliegenden Arbeit praktizierte Übertragung der Transmissionswerte in Bakterientrockensubstanz pro Volumen an Hand der von MANNHEIM (1964) erstellten Bezugskurve kann eine ähnlich gute Korrelationsgenauigkeit angenommen werden. Zu beachten ist jedoch, daß bei Messungen an anderen Keimen wegen der verschiedenen Absorption bei unterschiedlicher Teilchengröße jeweils wieder eigene Bezugskurven erstellt werden müssen.

Bei den direkten Meßmethoden, wie den Verfahren der Lebendkeimzählung und der Gesamtkeimzählung, die direkte Bestimmung von Trockengewicht und die Messung des Protein- oder Stickstoffgehaltes, wird stets ein Teil der Kultursubstanz zur Messung benötigt. Sie sind daher an einer Kultur nicht beliebig oft durchführbar und eignen sich eher zur Feststellung von Endzuständen nach einer bestimmten Bebrütungsdauer als für in der Zeit fortlaufende Messungen zur Ermittlung von Wachstumsraten. Daß letzteres in bestimmten Fällen wohl unter einigem Arbeitsaufwand doch auch möglich ist, zeigen die Arbeiten von FASSIN et al. (1955) und GARRETT et al. (1966). Eine andere

indirekte Meßmethode, die manometrische Messung von Atmungsgrößen, ist für die Hemmstoffanalytik ein gutes Verfahren, wie Arbeiten von KLEIN (1953) und KNOTHE, BUTENBERG (1955) zeigen. Sie ist aber in der Durchführung aufwendiger, vor allem, wenn zum besseren Vergleich mehrere parallel laufende Kulturen untersucht werden, und sie erfaßt nur die aeroben respiratorischen Stoffwechselaktivitäten, nicht hingegen die anaeroben energieliefernden Reaktionen. Die photometrische Trübungsmessung erscheint gerade in Verbindung mit der Bebrütung stehender Kulturen im Temperaturgradienten-Inkubator als die hier am ehesten angemessene Methode der Erfolgsmessung, weil sie mit der Zellmassenkonzentration den umfassendsten bioenergetischen Parameter erfaßt.

Eine Einschränkung des oben Gesagten muß dabei jedoch für den Versuch unter Verwendung des bakteriziden Ampicillin gemacht werden. Die Ausbildung von Sphäroblasten und die anschließende Lyse der Bakterien, die für den Wirkungsmechanismus der Penicilline mit dem Angriffspunkt an der Bakterienwand typisch ist, beeinflußt die Trübungsmessung. Zum einen verändert sich die Absorptionsgröße mit der Teilchengröße und der Teilchenform und zum anderen werden auch durch die Lyse angefallene Bakterientrümmern mitgemessen. Man kann zwar annehmen, daß die gleiche Meßungenauigkeit bei allen von Ampicillin gehemmten Kulturen in ähnlicher Stärke auftritt und sich der Fehler in gewisser Weise wieder ausgleicht, wenn man das Wachstumsverhalten der Kulturen zueinander in Beziehung setzt. Es soll aber doch darauf hingewiesen sein, daß die Ergebnisse aus diesem Versuch nur als bedingt quantitativ zu werten sind.

ac Bemerkungen zur Auswertung

Um ein Maß für die Größe des Wirkeffektes und seiner Abhängigkeit von der Temperatur zu haben, wurde für die jeweilige Temperaturstufe die Hemmkonzentration HK 50 % ermittelt, die gegenüber der hemmstofffreien Vergleichskultur eine 50 %-ige Hemmung in Bezug auf die Wachstumsrate beziehungsweise den Wachstumsertrag ergibt. Sie ist zur Größe des Wirkeffektes umgekehrt proportional. Das Erfassen und Vergleichen dieser 50 %-igen effektiven Dosis ist vor allem aus der pharmakologischen und toxiologischen Forschung bekannt, wurde aber auch wiederholt bei hemmstoffanalytischen Untersuchungen in der Mikrobiologie angewendet (siehe zum Beispiel HOPPS et al. (1956), CIAK, HAHN (1958), OBERZILL (1967), THEN (1973) und andere). Diese Größe wird deshalb bevorzugt, weil bei sigmoid verlaufenden Kurven von Dosis-Wirkungs-Beziehungen, wie sie auch bei den vorliegenden Untersuchungen gefunden wurden, im mittleren Anteil, wo sie am steilsten verlaufen, diese Beziehung am engsten ist und somit die schärfste Korrelation besteht. Die Aussagekraft dieses Wertes darf andererseits aber auch nicht überbewertet werden. So können daraus keine Hinweise auf den sonstigen Verlauf der Dosis-Wirkungskurve, vor allem auf deren Steilheit, gewonnen werden, sodaß unter Umständen für die Dosisgrößen, die eine 100 %-ige Wirkung erbringen, ganz andere Relationen bestehen können. Wenn die Betrachtung der HK 50 %-Werte wegen der größeren Genauigkeit für theoretische Untersuchungen über wirksame Substanzen am günstigsten erscheint, so sind gerade bei Angaben über antibakterielle Hemmstoffe für die praktische Medizin die Ermittlung der minimalen Hemmkonzentrationen wesentlicher.

Bei der Feststellung der HK 50 %-Werte wurde bei den Versuchen unter Verwendung von Chloramphenicol und Sulfamethoxydiazin das Verhalten der Wachstumsraten herangezogen. Diese wurden, wie schon oben ausgeführt, mit genügender Genauigkeit ermittelt und stellen gut vergleichbare echte Wachstumsgrößen dar. Bei dem Versuch, der die Ampicillinwirkung untersucht, konnten wegen des anderen Verlaufes der Wachstumskurven der gehemmten Kulturen keine Wachstumsraten ermittelt werden. Hier wurden die Wachstumserträge untereinander in Beziehung gesetzt. Dabei sind, wie schon oben ausgeführt, gewisse Ungenauigkeiten bei der Trübungsmessung anzunehmen. Eine weitere Ungenauigkeit liegt bei diesem Versuch darin, daß die Ertragswerte der ungehemmten Bezugskulturen eigentlich keine mit den anderen Kulturen vergleichbare Größen darstellen. Bei diesen Kulturen ist die Begrenzung des Wachstums durch die Bakteriendichte, die Abnahme der Nährstoffe und die Zunahme von Stoffwechselabbauprodukten im Sinne der stationären Phase eingetreten, wodurch dieser Ertragswert also verfälscht ist. Andererseits kann bei Betrachtung der Ergebnisse (siehe dazu Tabelle III und Abb. 9) auch bei alleiniger Beachtung der Verhältnisse bei den gehemmten Kulturen eine eindeutige Relation des verschiedenen Wachstumsverhaltens mit einem klaren Minimum der Wirkung im Temperaturbereich um 25° C nicht bestritten werden. Die beschriebenen "HK 50 %-Werte" können jedoch streng genommen nicht als quantitative Angaben gelten.

b Zu den Ergebnissen

Als das eigentliche, bei den vier Versuchen übereinstimmend gefundene Ergebnis ist die Tatsache anzusehen, daß die Hemmwirkung - bei Betrachtung der Verhältnisse bei einer 50 %-igen Hemmkonzentration der Substanzen - entlang eines Temperaturgradienten zunächst abnimmt, einige Grade unterhalb der optimalen Wachstumstemperatur am geringsten ist und dann mit weiter steigender Temperatur deutlich zunimmt. Diese Aussage bestätigt somit die Ergebnisse einiger schon eingangs erwähnter Arbeiten (RANTZ, KIRBY (1944), ESELTINE, RAHN (1949), GEURDEN (1970)), die zumindest qualitativ zu vergleichbaren Resultaten kamen. Ebenso lassen sich die Ergebnisse einiger weiterer Arbeiten (WHITE, PARKER (1938), WHITE (1939), HOYT et al. (1945), LEE, FOLEY (1945), ARRIAGADA (1952), KNOX, COLLARD (1952), KLUDAS, STÖSS (1954), FASSIN et al. (1955), KNOTHE, BUTENBERG (1955), WINKLER (1962), MUSCHEL et al. (1960), MAEKAWA et al. (1971)), die nur kleinere Temperaturbereiche berücksichtigen und im Vergleich nur Teilaussagen machen, in dieses Bild ohne Zwang einfügen.

Außer bei einigen Autoren (z.B. KNOX, COLLARD (1952)) werden keine Erklärungen für diese Zusammenhänge angegeben oder auch nur Erklärungsversuche unternommen (z.B. ESELTINE, RAHN (1949)). Auch die vorliegende Arbeit liefert im Grunde genommen nur eine Beschreibung dieser Verhältnisse, kann sie aber nicht schlüssig erklären. Es können hier also nur Versuche einer Deutung unternommen werden.

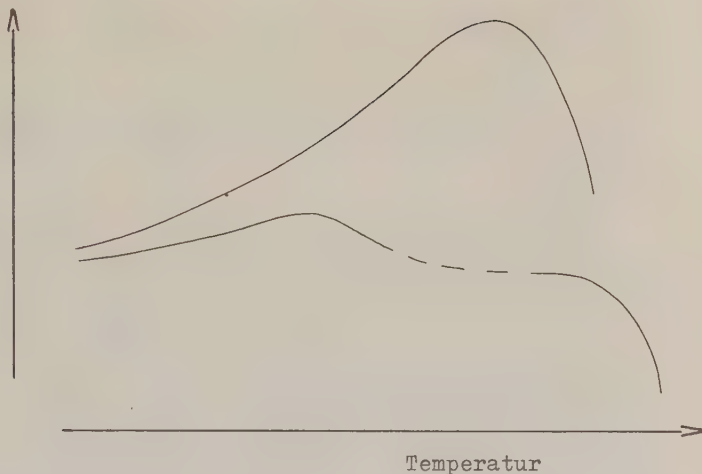
Aus der Tatsache, daß sich die Größe des Hemmeffektes nicht proportional zur Temperatur verhält und sich somit weder die für einzelne chemische

Reaktionen geltende RGT-Regel, noch die Arrhenius-Gleichung direkt anwenden läßt, ist zu schließen, daß es sich bei dem Hemmechanismus nicht um eine einzelne chemische Reaktion oder eine Reaktionskette mit einer limitierenden Reaktion handelt. Es ist daher ein komplexeres biologisches Geschehen anzunehmen. Der niedrige Hemmeffekt unterhalb des Temperaturoptimums des Wachstums kann ja, wie schon erwähnt, auch als in diesem Temperaturbereich besonders gute Widerstandskraft der Kultur gegenüber der Hemmsubstanz angesehen werden. Es wären dann mindestens zwei gegenläufige Vorgänge anzunehmen: ein destruierender, durch die Wirkung der Substanz hervorgerufener, und ein reparierender, der durch die Vitalität der Kultur bedingt ist. Der Gipfel der Widerstandskraft könnte somit als biologisches Optimum in einem bestimmten Temperaturbereich angesehen werden. In den Ausführungen von JOHNSON, EYRING, POLISSAR (1954) (Seiten 25 ff und 189 ff und dort zitierte Arbeiten), sowie vergleichbar auch bei CHRISTOPHERSEN (1955) (Seiten 196 ff und 203 ff), ALFORD (1960), INGRAHAM (1962) (Seiten 270 ff) und PATCHING, ROSE (1970) (Seite 25) wird die Erscheinung solcher Temperaturoptima erklärt. Dabei wird auch festgestellt, daß solche optimale Temperaturen außer für das Wachstum im ganzen auch für bestimmte Lebensvorgänge und bestimmte Stoffwechselleistungen gesondert vorhanden sein können. Sie können somit von der optimalen Wachstumstemperatur verschieden sein.

Für die hier zu diskutierenden Versuche heißt das, daß bei den verwendeten Hemmstoffen, bei denen eine Stoffwechselaktivität der Keime bekannterweise die Voraussetzung für ihr Wirken ist, die Hemmwirkung mit

wachsendem Stoffumsatz bei steigender Temperatur zwar absolut zunimmt (siehe dazu auch Abbildungen 6 - 9), daß aber der Zuwachs der Kultur, inbegriffen möglicherweise auch abwehrende und reparierende Vorgänge, diese zunächst übertrifft. Schon bevor das allgemeine Wachstum seinen höchsten Wert erreicht hat, werden die abwehrenden Mechanismen schwächer und die Hemmwirkung nimmt damit zu. Es kann sich dabei, wie bei KNOX, COLLARD (1952) beschrieben, um die Wirkung direkter Abwehrstoffe - dort Penicillinase - handeln, wobei die Penicillinasebildung in einem gegenüber dem Wachstum niedrigeren Temperaturbereich ihr Optimum hat, oder man kann allgemeine durch die Lebenskraft der Organismen bedingte Wachstums- und Reparationsmechanismen annehmen. Eine Erklärung für die Abnahme dieser Abwehrleistung schon in einem mittleren Temperaturbereich kann aus den Ausführungen von MITCHELL (1951) entnommen werden. Dort wird unter Berücksichtigung der Arbeit von JORDAN, JACOBS (1947) bei der Untersuchung des Wachstums von Kulturen bei verschiedenen Temperaturen "die Geschwindigkeit der Zellneubildung im ganzen, die Geschwindigkeit der Neubildung nicht vermehrungsfähiger Zellen und die Absterberate von Zellen" gegenübergestellt (MITCHELL (1951) Seite 128). Dabei zeigt sich, wie aus der dort vorhandenen Abbildung (ebenda Fig. 5.1.) veranschaulicht zu entnehmen ist, daß die Zunahme der Bildung lebensfähiger Zellen schon in einem mittleren Temperaturbereich - dort 25° - 30°C - im Vergleich zum Gesamtzuwachs gering wird.

Wachstumsrate



Skizzenhafte Darstellung der Wachstumsraten (Ordinate) bezogen auf das Gesamtwachstum (obere Kurve) und auf den Zuwachs lebensfähiger Keime (untere Kurve) in ihrer Abhängigkeit von der Temperatur (Abszisse) (Zitiert nach MITCHELL (1951) Seite 128, Fig. 5.1. und dort zitierte Arbeiten).

Es erscheint daher naheliegend, daß mit der relativen Abnahme (Verringerung der Rate) der Neubildung lebensfähiger Zellen auch die allgemeine Lebenskraft in der Kultur abnimmt, so daß diese gegenüber angreifenden Stoffen weniger widerstandsfähig wird. Der Gipfel der beschriebenen Rate des Wachstums lebensfähiger Organismen und der bei den vorliegenden Versuchen gefundene Gipfel der größten Toleranz gegenüber den angewendeten Hemmsubstanzen liegt dabei in dem gleichen Temperaturbereich. Wenn das Zustandekommen des Minimums der Hemmwirkung durch einen auf der Vitalität der Keime

beruhenden Abwehrprozeß erklärt wird, wäre es allerdings möglich, daß sich die Verhältnisse bei voll bakteriostatischen beziehungsweise bakteriziden Hemmstoffkonzentrationen verändert, da für die 'vitale' Abwehr von vorneherein nur geringere Möglichkeiten bestehen.

Wenn die zuletzt dargestellten Zusammenhänge dafür verantwortlich - oder zumindest entscheidend mitverantwortlich - sind, daß das Toleranzmaximum der Kultur einige Grade unterhalb der optimalen Wachstumstemperatur liegt, kann erwartet werden, daß gleichartige Verhältnisse auch bei Anwendung anderer antibiotischer Substanzen auf andere Keime bestehen. Es wäre dann allgemein damit zu rechnen, daß die Hemmwirkung solcher Stoffe einige Grade unterhalb der optimalen Wachstumstemperatur am geringsten ist, und daß sie dann mit Annäherung an diese zunimmt. Für mesophile Keime wäre dann zu erwarten, daß der Bereich, in dem die Hemmwirkung mit der Temperatur zunimmt, in für den Menschen physiologischen Temperaturbereichen liegt.

c Zur Klinik

Die Frage, in wie weit die Erhöhung der Wirkung antibiotischer Substanzen bei Temperaturen oberhalb 37° C für die praktische Medizin von Bedeutung ist, wurde schon von mehreren Autoren aufgeworfen; (siehe dazu: WHITE, PARKER (1938), EAGLE, MUSSELMAN (1944), HOYT et al. (1945), ARRIAGADA (1952), KNOX, COLLARD (1952), KLUDAS, STÖSS (1954), KNOTHE, BUTENBERG (1955)). Bei allen diesen Arbeiten besteht die Tendenz, aus theoretischen Überlegungen heraus eine Kombination von Antibiotikatherapie und Fiebertherapie (beziehungsweise Hyperthermie) als gegenüber einer alleinigen Chemotherapie wirkungsvoller zu beurteilen.

BALLENGER et al. (1937), LAMPERT (1949), LAPORTE (1950), MUGGENTHALER (1950), MARKS (1951) und BERGER (1952) berichten aus der Klinik, EAGLE et al. (1947) aus einer Tierversuchsreihe über verbesserte Erfolge mit dieser kombinierten Therapie. Diese Behandlungsweise war in der damaligen Zeit in der praktischen Medizin durchaus gebräuchlich (dazu z.B. BAUMGARTEN), wurde dann jedoch, wohl weil immer bessere chemotherapeutische Substanzen zur Verfügung standen, wieder mehr und mehr verlassen.

Ausgehend von den vorliegenden Ergebnissen aus den hier durchgeführten in vitro Versuchen, bei denen für die untersuchten Substanzen eine Wirkungssteigerung oberhalb der für den Menschen physiologischen Körpertemperatur von etwa 37° C gefunden wurde, könnte man zu gleichen Folgerungen kommen, wie sie in den oben genannten Arbeiten beschrieben sind. Allerdings können - wie schon früher erwähnt - die quantitativen Angaben, die für eine 50 %-ige Hemmdosis gelten, absolut und in ihrer Relation nicht direkt auf die Verhältnisse übertragen werden, die bei der für die praktische Medizin bedeutenderen minimalen Hemmkonzentration bestehen. Fraglich bleibt außerdem, wie weit die gefundenen Ergebnisse auf andere Substanzen und bei Einwirkung auf andere Keime verallgemeinert werden können, obwohl es durchaus wahrscheinlich erscheint, daß zumindest bei mesophilen Keimen ähnliche Verhältnisse bestehen. Weiterhin wäre zur Anwendung einer erhöhten Körpertemperatur als therapeutisches Konzept zu sagen, daß das, was wir als Fieber bezeichnen, ein so komplexes Geschehen ist, das neben der damit ein-

hergehenden Erhöhung der Abwehrfunktionen auch eine Belastung für den Gesamtorganismus darstellt, die nicht exakt faßbar ist und die nicht immer wünschenswert erscheint.

So erscheint bei Anwendung gut wirksamer Mittel, die eine ausreichende therapeutische Breite haben, die alleinige chemotherapeutische Behandlung angebracht. Eine zusätzliche Erhöhung der Körpertemperatur wäre hier unnötig; andererseits wäre aber auch eine zu forsche antipyretische Therapie nicht gerade wünschenswert, wenn hierfür nicht anderweitige Gründe bestehen. Bei Problemkeimen, bei Probleminfektionen und bei Verwendung relativ toxischer Mittel sollte jedoch vielleicht wieder öfter an die Möglichkeit der Wirkungssteigerung der Therapeutika durch ein Anheben der lokalen oder allgemeinen Körpertemperatur gedacht werden.

E Zusammenfassung

Über die Temperaturabhängigkeit der Wirkung antibakterieller Chemotherapeutika finden sich in der Literatur nur wenig und meist ungenaue oder auch widersprüchliche Angaben. Sie stammen zum größten Teil aus der frühen Zeit der "Antibiotischen Aera". Es wird hier daher versucht, diese Abhängigkeit mit einer bei dieser Fragestellung noch nicht angewendeten Methodik genauer zu bestimmen. Beispielhaft wird dabei die Wirkung von Chloramphenicol, Sulfamethoxydiazin und Ampicillin an Escherichia coli NCTC 9001 und von Chloramphenicol an Enterobacter carotovorus 1008 CCM (15713 ATCC) untersucht. Die Methode beruht im wesentlichen auf der Verwendung eines Temperaturgradienten-Inkubators, der erlaubt, gleichzeitig 90 Röhrchenkulturen zu bebrüten (jeweils 5 bei 18 verschiedenen entlang eines Gradienten gelegenen Temperaturen) und auf der Anwendung der photometrischen Trübungsmessung zur Bestimmung des Wachstumserfolges. Über die dabei ermittelten Größen der jeweiligen 50 %-igen Hemmdosis wird auf die Wirkgröße rückgeschlossen. Als Ergebnis findet sich entlang des Temperaturgradienten zunächst eine Abnahme der Wirksamkeit, einige Grade unterhalb der optimalen Wachstumstemperatur ergibt sich ein Wirkungsminimum und mit weiter ansteigender Temperatur nimmt die Wirkung wieder zu. Aus diesem Verhalten der

Wirkgröße wird geschlossen, daß der Hemmvorgang nicht allein auf einer chemischen Reaktion beruht, sondern daß er als Wirkvorgang in einem komplexen biologischen Geschehen angesehen werden muß. Das Wirkminimum in dem oben angeführten Temperaturbereich wird dabei als besonders gute Widerstandskraft der Kultur gegenüber dem Hemmstoff entsprechend einem biologischen Temperatur-optimum gedeutet. In dem für den Menschen physiologischen Temperaturbereich zwischen 36° und 40°C ist bei den durchgeführten Versuchen jeweils eine Zunahme der Wirkgröße der Hemmung mit steigender Temperatur festzustellen. Es wird vermutet, daß ähnliche Zusammenhänge auch bei der Anwendung anderer Hemmstoffe auf andere mesophile Keime erwartet werden können. In Bezug auf die Klinik werden mögliche sich aus den Ergebnissen anbietende Folgerungen für die praktische Medizin aufgezeigt.

Tabelle I: Aufstellung der R₂-Werte (Wachstumsraten in Bezug auf den Logarithmus der Basis 2) bei den 18 Bebrütungstemperaturen und bei den verschiedenen Hemmstoffkonzentrationen (O - O; A - 0,5; B - 1,0; C - 1,5; D - 2,0; E - 2,5 µg/ml Chloramphenicol) (bei Anwendung auf *Escherichia coli* NCTC 9001)
Aufstellung der HK 50%-Werte (µg/ml) bei den Bebrütungstemperaturen.
Aufstellung der 1/HK 50%-Werte (1/µg/ml) bei den Bebrütungstemperaturen.

Nr.	Temp.	Portionen:					HK 50%	1/HK 50%
		O	A	B	C	D		
1	15,25°	0,42		0,13	0,09	0,09	0,75	1,33
2	17,10°	0,42		0,18	0,14	0,11	0,83	1,20
3	18,95°	0,51		0,19	0,17	0,16	0,98	1,02
4	20,80°	0,63		0,37	0,26	0,23	1,20	0,83
5	22,65°	0,75		0,45	0,34	0,28	1,32	0,76
6	24,50°	0,90		0,57	0,43	0,36	1,43	0,70
7	26,35°	1,07		0,67	0,54	0,45	1,53	0,65
8	28,20°	1,26		0,77	0,62	0,53	1,45	0,69
9	30,05°	1,47		0,89	0,72	0,59	1,47	0,68
10	31,90°	1,64		0,97	0,82	0,59	1,42	0,70
11	33,75°	1,85	1,37	1,04	0,81	0,57	1,22	0,82
12	35,60°	2,04	1,43	1,04	0,77	0,53	1,03	0,97
13	37,45°	2,22	1,44	1,00	0,72	0,48	0,86	1,16
14	39,30°	2,42	1,41	0,96	0,67	0,45	0,68	1,47
15	41,15°	2,44	1,37	0,90	0,52	0,31	0,62	1,61
16	43,00°	2,28	1,24	0,77	0,33	0,20	0,59	1,69
17	44,85°	2,00	1,15	0,56	0,21	0,18	0,60	1,67
18	46,70°	0,65	-	-	-	-	-	-

Tabelle II: Aufstellung der R_2 -Werte (Wachstumsraten in Bezug auf den Logarithmus der Basis 2) bei den 18 Bebrütungstemperaturen und bei den verschiedenen Hemmstoffkonzentrationen (O - O; A - 1; B - 2; C - 4; D - 6; E - 8, $\mu\text{g/ml}$ Sulfamethoxydiazin) (bei Anwendung auf *Escherichia coli* NGTC 9001)
Aufstellung der HK 50%-Werte ($\mu\text{g/ml}$) bei den Bebrütungstemperaturen.
Aufstellung der 1/HK 50%-Werte ($1/\mu\text{g/ml}$) bei den Bebrütungstemperaturen.

Nr.	Temp.	Portionen:					HK 50%	1/HK 50%
		O	A	B	C	D		
1	15,25°	0,28	0,25	0,18	-	-	2,52	0,40
2	17,10°	0,33	0,36	0,25	0,07	-	3,36	0,30
3	18,95°	0,45	0,42	0,36	0,07	0,07	3,26	0,31
4	20,80°	0,56		0,45	0,22	0,18	3,54	0,28
5	22,65°	0,64		0,59	0,30	0,19	3,84	0,26
6	24,50°	0,94		0,73	0,38	0,23	3,34	0,30
7	26,35°	1,04		0,91	0,51	0,24	3,90	0,25
8	28,20°	1,25		1,05	0,59	0,33	3,84	0,26
9	30,05°	1,40		1,21	0,68	0,45	3,92	0,25
10	31,90°	1,61		1,33	0,73	0,53	3,68	0,27
11	33,75°	1,85		1,44	0,84	0,62	3,58	0,28
12	35,60°	1,99		1,47	0,93	0,68	3,66	0,27
13	37,45°	2,13		1,47	0,91	0,67	3,36	0,30
14	39,30°	2,19		1,36	0,85	0,67	2,84	0,35
15	41,15°	2,30		1,16	0,70	0,57	2,04	0,49
16	43,00°	2,24	1,45	0,71	0,49	0,36	1,20	0,83
17	44,85°	1,69	0,97	0,64	0,43	0,31	1,30	0,77
18	46,70°	-	-	-	-	-	-	-

Tabelle III: Aufstellung der Wachstumserträge bei den 18 Bebrütungstemperaturen und bei den verschiedenen Hemmstoffkonzentrationen (O - 0; A - 0,5; B - 1,0; C - 1,5; D - 2,0; E - 2,5; F - 3,0 μ g/ml Ampicillin) (bei Anwendung auf Escherichia coli NCTC 9001)

Aufstellung der HK 50%-Werte (μ g/ml) bei den Bebrütungstemperaturen.
Aufstellung der 1/HK 50%-Werte (1/ μ g/ml) bei den Bebrütungstemperaturen.

Nr.	Temp.	Portionen:						F	HK 50%	1/HK 50%
		O	A	B	C	D	E			
1	15,25°	550			175	60	47	41	1,26	0,79
2	17,10°	560			215	86	54	37	1,30	0,77
3	18,95°	580			230	110	47	41	1,44	0,69
4	20,80°	580			330	140	54	41	1,57	0,64
5	22,65°	580			335	165	62	34	1,64	0,61
6	24,50°	600			370	170	55	36	1,68	0,60
7	26,35°	580		490	370	170	59		1,66	0,60
8	28,20°	590		470	330	135	56		1,61	0,62
9	30,05°	570		445	300	108	60		1,51	0,66
10	31,90°	590	540	435	250	70			1,39	0,72
11	33,75°	580	520	370	210	62			1,25	0,80
12	35,60°	570	490	340	150	65			1,11	0,90
13	37,45°	550	465	233	102	62			0,91	1,10
14	39,30°	540	430	142	86	54			0,77	1,29
15	41,15°	490	350	115	74	40			0,67	1,49
16	43,00°	440	270	80	42	35			0,57	1,75
17	44,85°	370	170	41	23	21			0,39	2,56
18	46,70°	150	32	19	27	20			0,31	3,23

Tabelle IV: Aufstellung der R₂-Werte (Wachstumsraten in Bezug auf den Logarithmus der Basis 2) bei den 18 Bebrütungstemperaturen und bei den verschiedenen Hemmstoffkonzentrationen (O - O; A - 0,3; B - 0,9; C - 1,5; D - 2,1; E - 2,7; F - 3,3 µg/ml Chloramphenicol) (bei Anwendung auf *Enterobacter carotovorus* 1008 CCM (15713 ATCC)). Aufstellung der HK 50%-Werte (µg/ml) bei den Bebrütungstemperaturen. Aufstellung der 1/HK 50%-Werte (1/µg/ml) bei den Bebrütungstemperaturen.

Nr.	Temp.	Portionen:						HK 50%	1/HK 50%
		O	A	B	C	D	E		
1	9,70°	0,10			-	-	-	-	-
2	11,55°	0,14			0,10	0,09	0,08	3,50	0,29
3	13,40°	0,20			0,15	0,14	0,12	3,50	0,29
4	15,25°	0,26			0,20	0,18	0,14	3,15	0,32
5	17,10°	0,30			0,23	0,21	0,14	2,75	0,36
6	18,95°	0,37			0,24	0,20	0,15	2,30	0,43
7	20,80°	0,48		0,35	0,27	0,20	0,16	1,78	0,56
8	22,65°	0,59		0,40	0,27	0,19	0,15	1,46	0,68
9	24,50°	0,65		0,42	0,26	0,18	0,14	1,22	0,82
10	26,35°	0,75		0,40	0,24	0,16	0,12	1,03	0,91
11	28,20°	0,87	0,73	0,42	0,23	0,16		0,88	1,14
12	30,05°	0,95	0,76	0,40	0,21	0,15		0,74	1,35
13	31,90°	1,11	0,80	0,37	0,20	0,13		0,58	1,72
14	33,75°	1,22	0,81	0,32	0,16	0,13		0,46	2,17
15	35,60°	1,05	0,71	0,24	0,13	0,12		0,44	2,27
16	37,45°	0,72	0,40	1,11	0,08	0,07		0,35	2,86
17	39,30°	0,29	0,0	-	-	-		-	-
18	41,15°	0,0	-	-	-	-		-	-

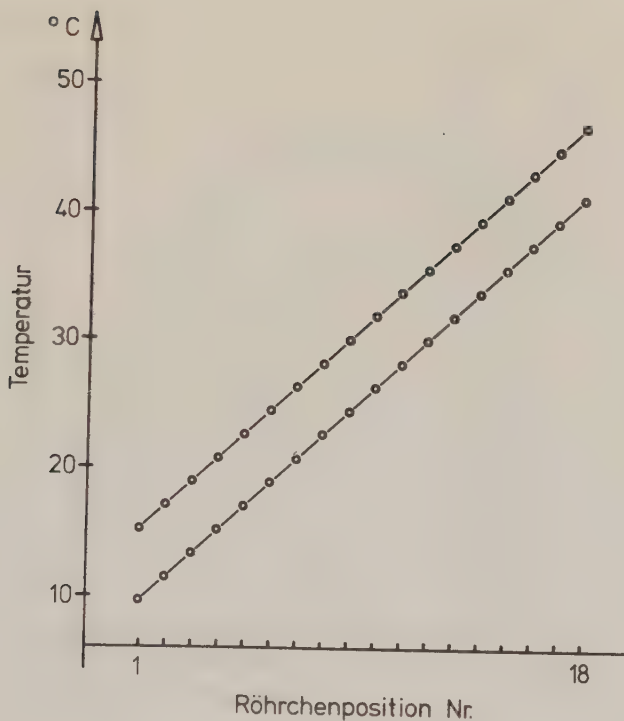


Abbildung 1: Kurven zweier für die Versuche eingestellter Temperaturgradienten; sie zeigen die Temperatur bei den jeweiligen Röhrchenpositionen an: (siehe dazu auch die Tabelle auf Seite 8)

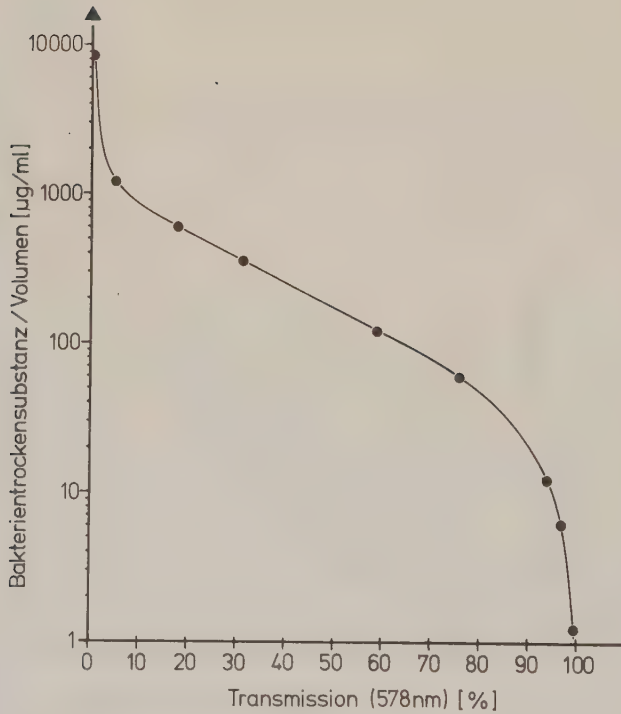


Abbildung 2: Beziehung zwischen Bakterientrockensubstanz (bei 80°C) pro Volumen und Transmission (578 nm) bei spätexponentiellen Zellen von Escherichia coli (übernommen von MANNHEIM (1964)).

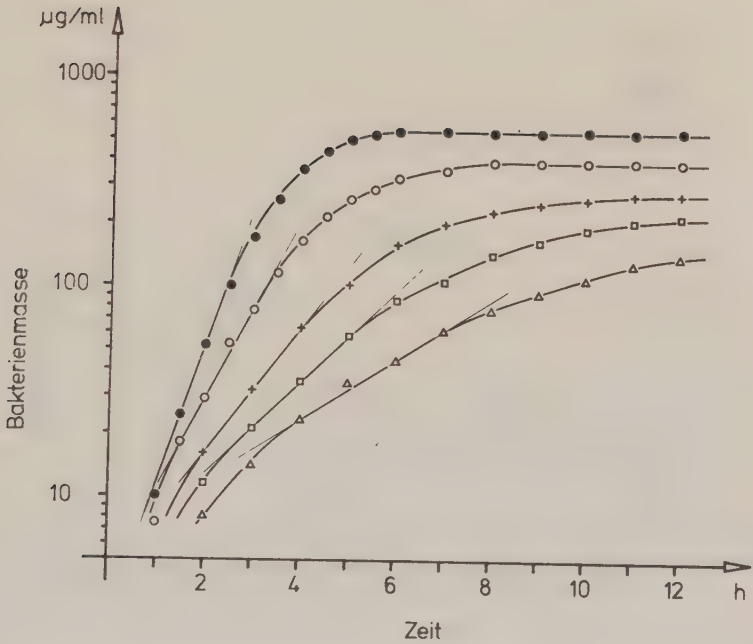


Abbildung 3: Turbidimetrische Wachstumskurven von Escherichia coli NCTC 9001 bei einer Bebrütungs-temperatur von 37,45°C in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von Chloramphenicol (● = 0,0 µg/ml (Vergleichskultur); ○ = 0,5 µg/ml; + = 1,0 µg/ml; □ = 1,5 µg/ml; △ = 2,0 µg/ml)

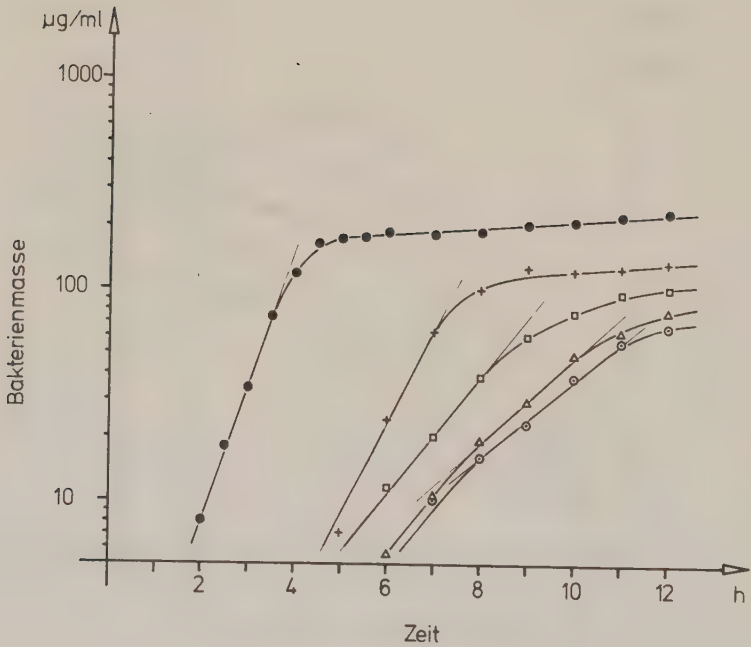


Abbildung 4: Turbidimetrische Wachstumskurven von *Escherichia coli* NCTC 9001 bei einer Bebrütungstemperatur von $37,45^{\circ}\text{C}$ in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von Sulfamethoxydiazin (● = $0,0 \text{ } \mu\text{g/ml}$ (Vergleichskultur); + = $2,0 \text{ } \mu\text{g/ml}$; □ = $4,0 \text{ } \mu\text{g/ml}$; Δ = $6,0 \text{ } \mu\text{g/ml}$; ○ = $8,0 \text{ } \mu\text{g/ml}$)

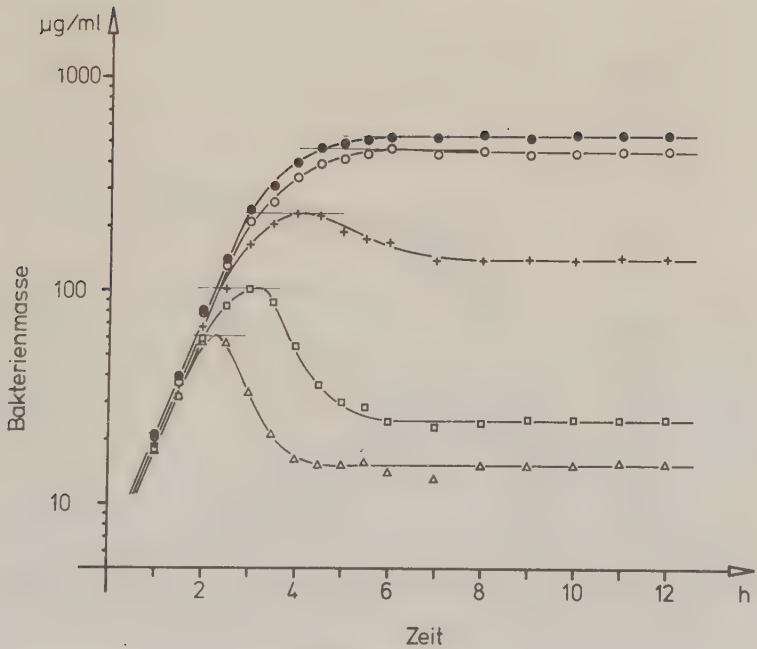


Abbildung 5: Turbidimetrische Wachstumskurven von *Escherichia coli* NCTC 9001 bei einer Bebrütungs-temperatur von $37,45^{\circ}\text{C}$ in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von Ampicillin (● = $0,0 \mu\text{g/ml}$ (Vergleichskultur); ○ = $0,5 \mu\text{g/ml}$; + = $1,0 \mu\text{g/ml}$; □ = $1,5 \mu\text{g/ml}$; △ = $2,0 \mu\text{g/ml}$)

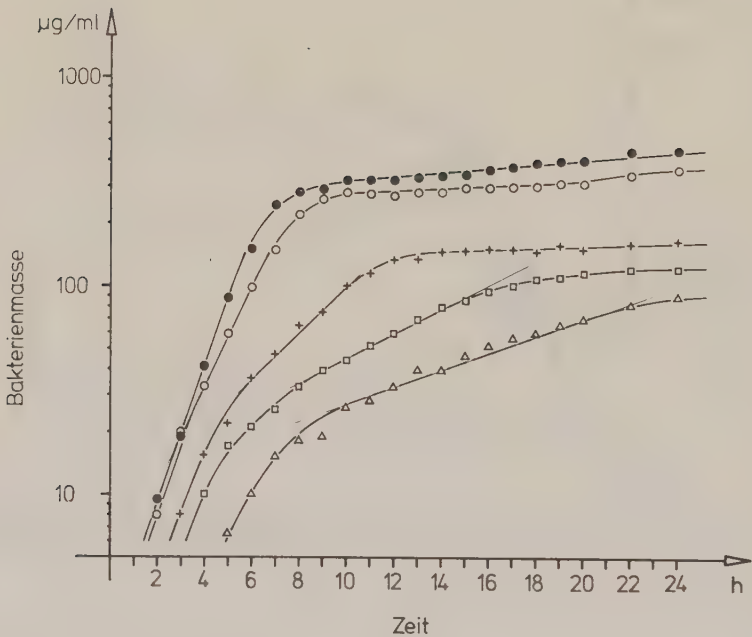


Abbildung 6: Turbidimetrische Wachstumskurven von Enterobacter carotovorus 1008 CCM bei einer Bebrütungs-temperatur von $31,9^{\circ}\text{C}$ in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von Chloramphenicol (● = $0,0 \mu\text{g/ml}$ (Vergleichskultur); ○ = $0,3 \mu\text{g/ml}$; + = $0,9 \mu\text{g/ml}$; □ = $1,5 \mu\text{g/ml}$; △ = $2,1 \mu\text{g/ml}$)

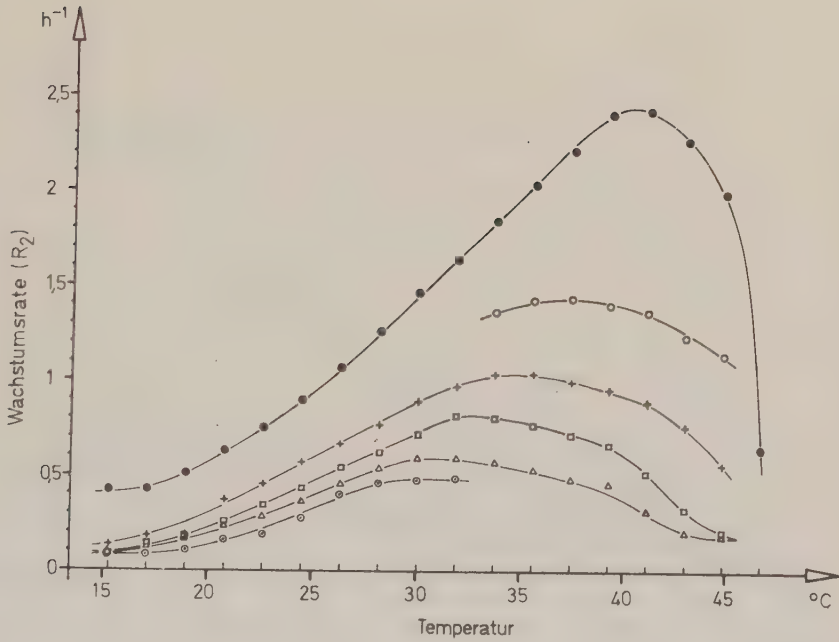


Abbildung 7: Abhängigkeit der Wachstumsraten von *Escherichia coli* NCTC 9001 von der Temperatur in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von Chloramphenicol (● = 0,0 $\mu\text{g/ml}$ (Vergleichskultur); ○ = 0,5 $\mu\text{g/ml}$; + = 1,0 $\mu\text{g/ml}$; □ = 1,5 $\mu\text{g/ml}$; △ = 2,0 $\mu\text{g/ml}$; ○ = 2,5 $\mu\text{g/ml}$)

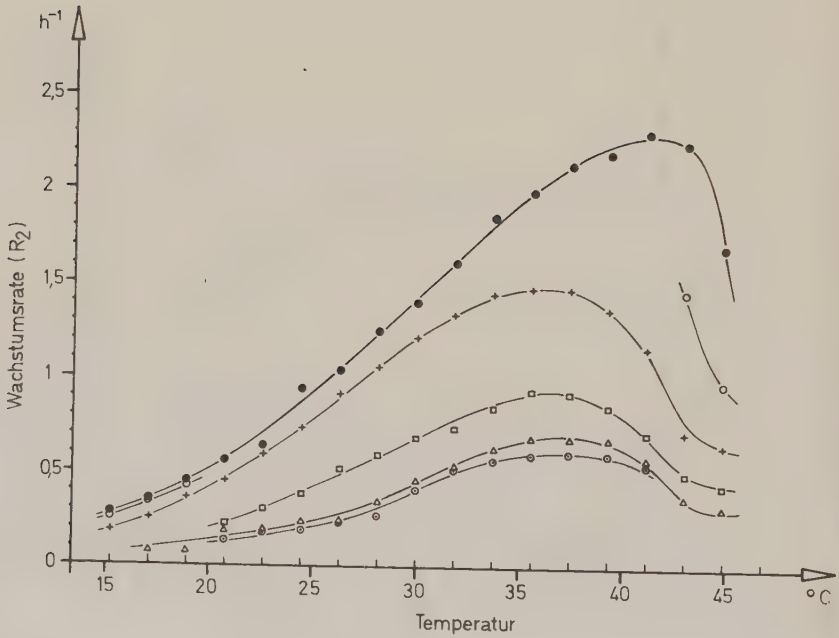


Abbildung 8: Abhängigkeit der Wachstumsraten von Escherichia coli NCTC 9001 von der Temperatur in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von Sulfamethoxydiazin ($\bullet$ = 0,0 $\mu g/ml$ (Vergleichskultur); $\circ$ = 1,0 $\mu g/ml$; $+$ = 2,0 $\mu g/ml$; $\square$ = 4,0 $\mu g/ml$; Δ = 6,0 $\mu g/ml$; $\ominus$ = 8,0 $\mu g/ml$)

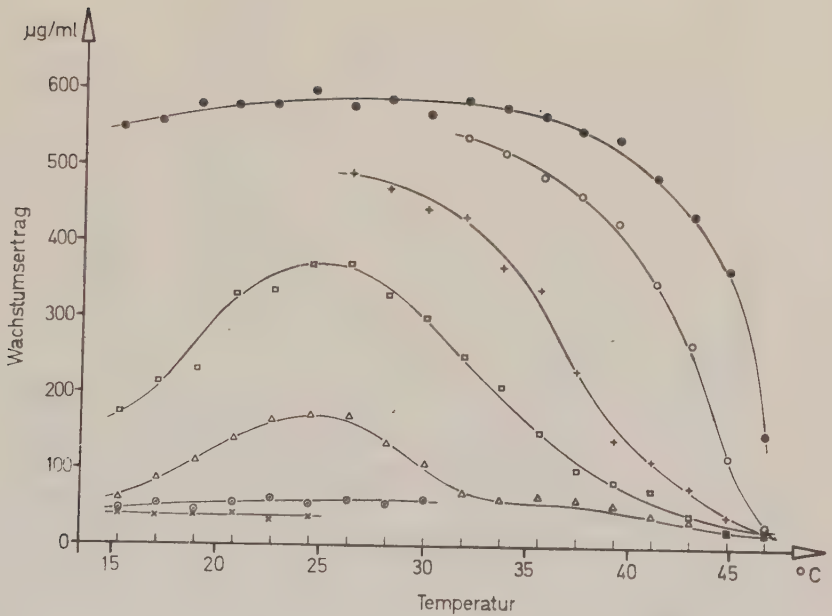


Abbildung 9: Abhängigkeit der Wachstumserträge von *Escherichia coli* NCTC 9001 von der Temperatur in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von Ampicillin (○ = 0,0 µg/ml (Vergleichskultur); ● = 0,5 µg/ml; + = 1,0 µg/ml; □ = 1,5 µg/ml; △ = 2,0 µg/ml; ○ = 2,5 µg/ml; × = 3,0 µg/ml)

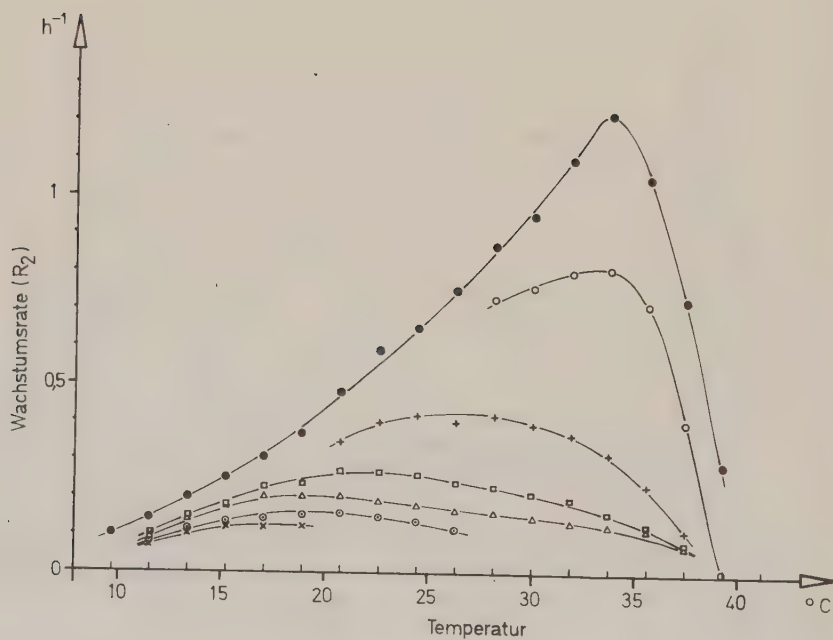


Abbildung 10: Abhängigkeit der Wachstumsraten von Enterobacter carotovorus 1008 CCM von der Temperatur in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von Chloramphenicol (● = 0,0 $\mu g/ml$ (Vergleichskultur); ○ = 0,3 $\mu g/ml$; + = 0,9 $\mu g/ml$; □ = 1,5 $\mu g/ml$; △ = 2,1 $\mu g/ml$; ◊ = 2,7 $\mu g/ml$; × = 3,3 $\mu g/ml$)

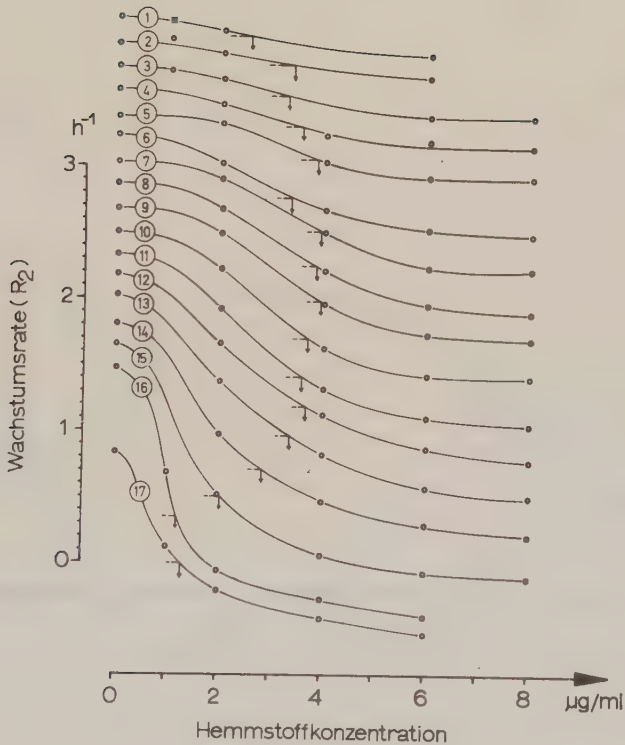


Abbildung 11: Dosis-Wirkungsbeziehungen - bei dem Versuch mit Sulfamethoxydiazin - aus denen auf graphischem Wege die Hemmkonzentrationen mit gegenüber der Vergleichskultur 50 %-iger Hemmung (= HK 50 %) ermittelt wurden.

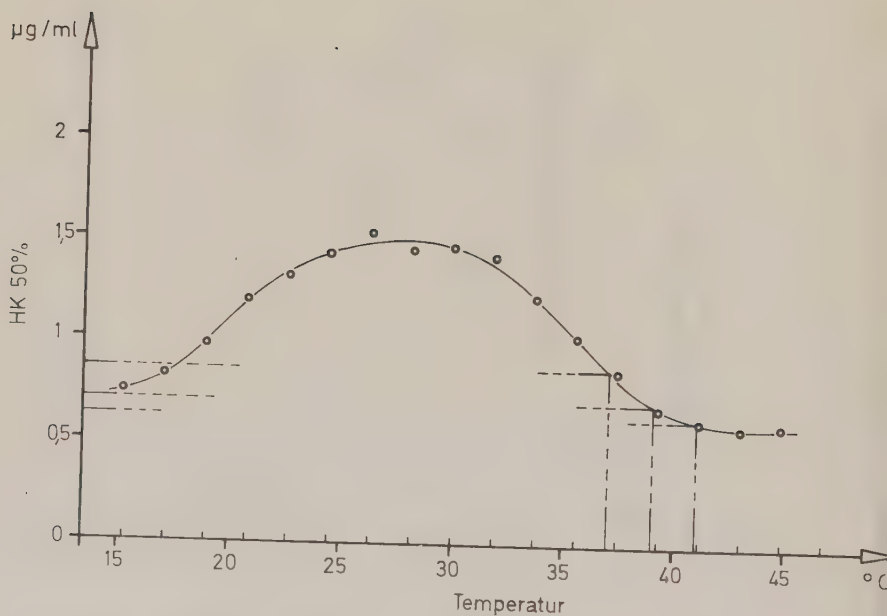


Abbildung 12: Abhängigkeit der HK 50 %-Werte von der Temperatur (bei dem Versuch unter Anwendung von Chloramphenicol an Escherichia coli NCTC 9001). Die HK 50 %-Werte bei 37°, 39° und 41°C sind hier graphisch ermittelt (siehe dazu Seite 18).

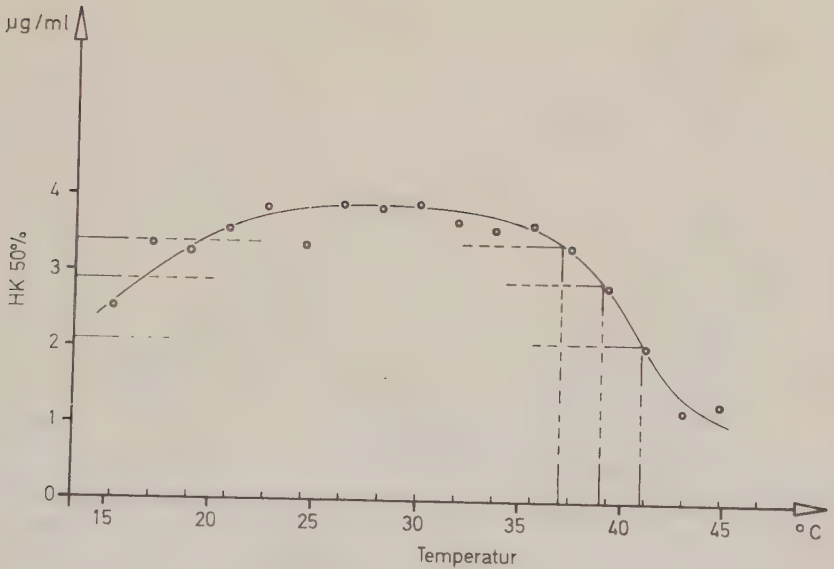


Abbildung 13: Abhängigkeit der HK 50 %-Werte von der Temperatur (bei dem Versuch unter Anwendung von Sulfamethoxydiazin an Escherichia coli NCTC 9001). Die HK 50 %-Werte bei 37°, 39° und 41°C sind hier graphisch ermittelt (siehe dazu Seite 18).

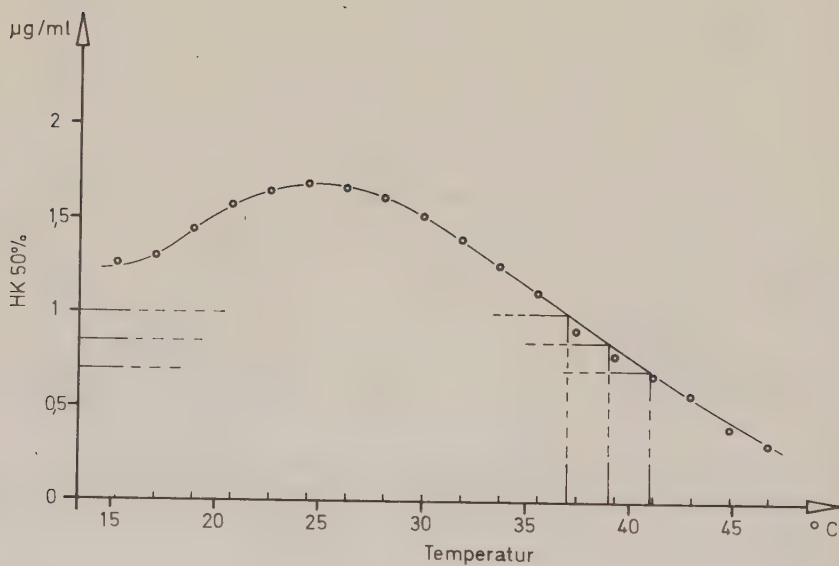


Abbildung 14: Abhängigkeit der HK 50 %-Werte von der Temperatur (bei dem Versuch unter Anwendung von Ampicillin auf Escherichia coli NCTC 9001). Die HK 50 %-Werte bei 37°, 39° und 41°C sind hier graphisch ermittelt (siehe dazu Seite 18).

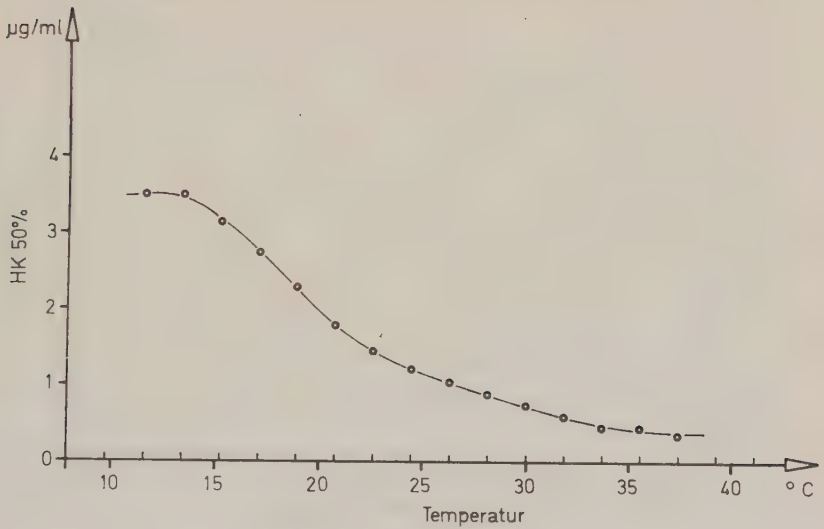


Abbildung 15: Abhängigkeit der HK 50 %-Werte von der Temperatur (bei dem Versuch unter Anwendung von Chloramphenicol an Enterobacter carotovorus 1008 CCM).

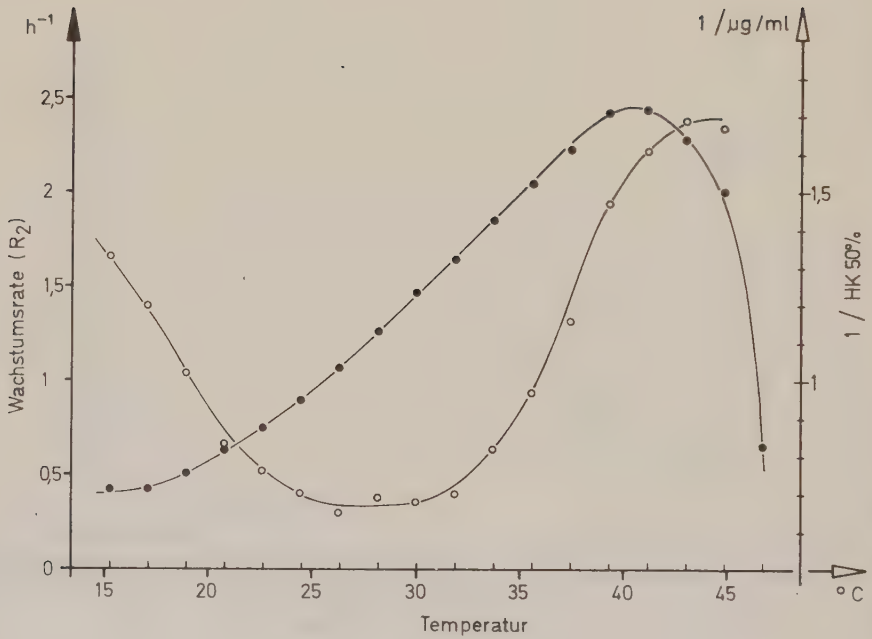


Abbildung 16: Gegenüberstellung der Temperaturabhängigkeit der Wachstumsraten (—●—) einerseits und der Temperaturabhängigkeit der $1/HK\ 50\%$ -Werte (—○—), die ein Maß für die Wirkgröße sind, andererseits. (Bei dem Versuch unter Anwendung von Chloramphenicol auf Escherichia coli NCTC 9001)

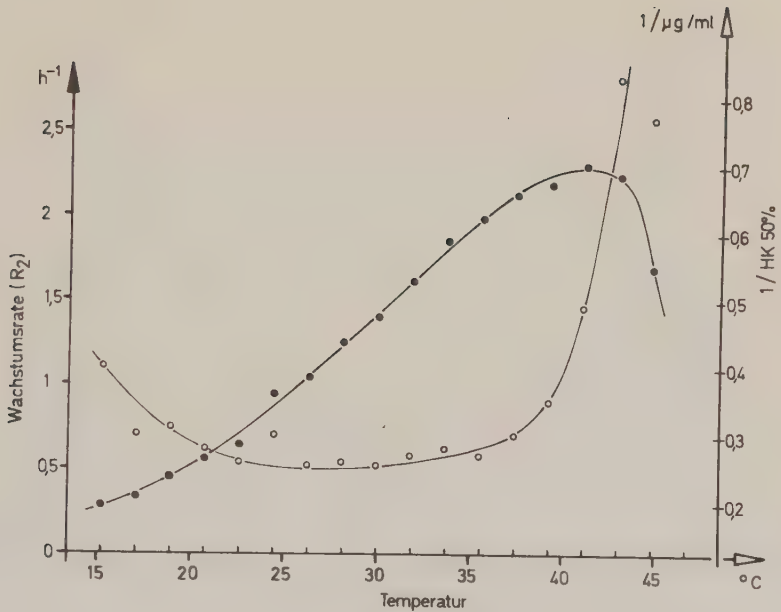


Abbildung 17: Gegenüberstellung der Temperaturabhängigkeit der Wachstumsraten (—●—) einerseits und der Temperaturabhängigkeit der $1/HK.50\%$ -Werte (—○—), die ein Maß für die Wirkgröße sind, andererseits. (Bei dem Versuch unter Anwendung von Sulfamethoxydiazin auf Escherichia coli NCTC 9001)

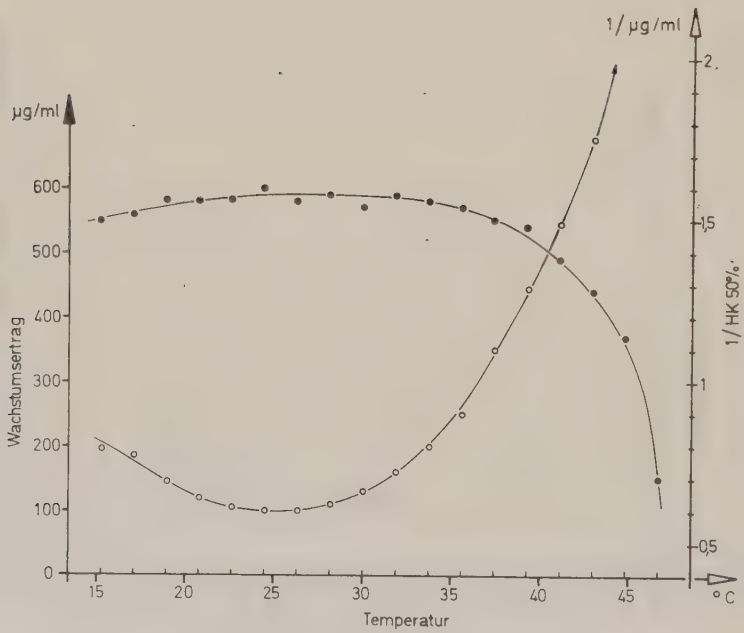


Abbildung 18: Gegenüberstellung der Temperaturabhängigkeit der Wachstumserträge (—●—) einerseits und der Temperaturabhängigkeit der 1/HK 50 %-Werte (—○—), die ein Maß für die Wirkgröße sind, andererseits. (Bei dem Versuch unter Anwendung von Ampicillin auf Escherichia coli NCTC 9001)

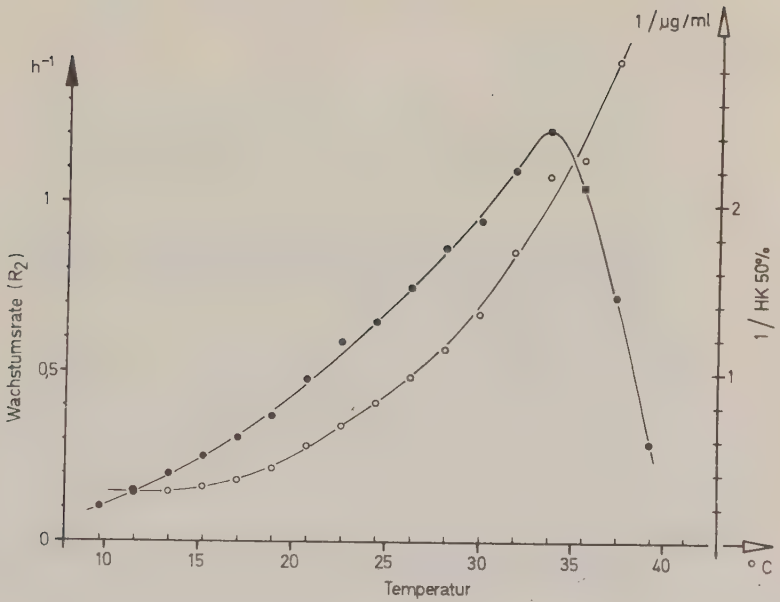


Abbildung 19: Gegenüberstellung der Temperaturabhängigkeit der Wachstumsraten (—●—) einerseits und der Temperaturabhängigkeit der $1/HK 50\%$ -Werte (—○—), die ein Maß für die Wirkgröße sind, andererseits. (Bei dem Versuch unter Anwendung von Chloramphenicol auf Enterobacter carotovorus 1008 CCM)

H Literatur

- ALFORD J.A.: Effect of incubation temperature on biochemical tests in the genera *Pseudomonas* and *Achromobacter*. J. Bact. 79 (1960) 591-593
- ARRIAGADA A.V.: Estado actual de las investigaciones sobre los efectos de 42° de temperatura sobre la virulencia del Bacilo de Koch y sobre la actividad de las sustancias antibacterianas. Rev. clin. espan. 47 (1952) 17-18
- BALLENGER E., ELDER D., MC DONALD H.: Sulfonamide and thermotherapy in gonococcic infections: preliminary report. J. Amer. Med. Assoc. 109 (1937) 1037
- BAUMGARTEN F. (Chefarzt d. Int. Abteilung d. KKH Füssen): Mündliche Mitteilung
- BEHRING E. von: Ueber Desinfektion, Desinfektionsmittel und Desinfektionsmethoden. Z. Hyg. Infektionskrankh. 9 (1890) 395-478
- BERGER W.: Bisherige Erfahrungen mit einer kombinierten Chloromycetin-Sulfonamid-Pyripher-Therapie bei typhösen Erkrankungen. Dtsch. med. Wschr. (1951) 1592
- BIGGER J.W.: Treatment of staphylococcal infections with Penicillin. Lancet 247 (1944) 497-500
- BÖNICKE R.: Über die mikrobiologischen Methoden zur Wertbestimmung von antibiotischen und chemotherapeutischen Substanzen. Zbl. Bakter. (Paras. Infkh. u. Hyg.) I Org. 157 (1951/52) 158-161
- CHRISTOPHERSEN J.: in: PRECHT H., CHRISTOPHERSEN J., HENSEL H.: Temperatur und Leben. Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1955)
- CIAK J., HAHN F.E.: Mechanisms of action of antibiotics I. additive action of Chloramphenicol and Tetracyclines on the growth of *Escherichia coli*. J. Bact. 75 (1958) 125-129

- COOPER K.E., GILLESPIE W.A.: The influence of temperature on streptomycin inhibition zones in agar cultures. J. Gen. Microbiol. 7 (1952) 1-7
- COOPER K.E., LINTON A.H.: The importance of the temperature during the early hours of incubation of agar plates in assays. J. Gen. Microbiol. 7 (1952) 8-17
- DAVIS B.D.A., DULBECGO R., EISEN H.N., GINSBERG H.S., WOOD W.B.: Microbiology. Hoeber medical division - Harper u. Row, Publishers, New York-Evanston-London (1968)
- EAGLE H., MAGNUSON H.J., FLEISCHMAN R.: The effect of hyperpyrexia on the therapeutic efficacy of Penicillin in experimental syphilis. Amer. Jour. Syph., Gonorr., Ven. Dis. 31 (1947) 239-245
- EAGLE H., MUSSELMAN A.D.: The spirocheticidal action of Penicillin in vitro and its temperature coefficient. J. of Exp. Med. 80 (1944) 493-505
- ELLIOTT R.P.: Temperature-gradient incubator for determining the temperature range of growth of microorganisms. J. Bact. 85 (1963) 889-894
- ERICSSON H., HÖGMAN C., WICKMAN K.: A paper disk method for determination of bacterial sensitivity to chemotherapeutic and antibiotic agents. Scandinav. J. Clin. u. Lab. Investigation 6, Suppl. 11 (1954) 23-36
- ERICSSON H.: The paper disk method for determination of bacterial sensitivity to antibiotics. Studies on the accuracy of the technique. Scandinav. J. Clin. u. Lab. Investigation 12 (1960) 408-413
- ERICSSON H., TUNEVALL G., WICKMAN K.: The paper disk method for determination of bacterial sensitivity to antibiotics. Relationship between the diameter of the zone of inhibition and the minimum inhibitory concentration. Scandinav. J. Clin. u. Lab. Investigation 12 (1960) 414-422
- ERICSSON H., REYN A., BENTZON M.W.: Comparative investigation with dilution and diffusion methods of gonococcal sensitivity to antibiotics. Acta Pathol. Microbiol. Scand. Suppl. 154 (1962) 293-298

- ERICSSON H.: The disc method in quantitative determination of sensitivity to antibiotics. Postgrad Med. J. 43 Suppl. 43 (1967) 46-49
- ERICSSON H., SHERRIS J.C.: Antibiotic sensitivity testing. Report of an international collaborative study. Acta Pathol. Microbiol. Scand. (B) 217 Suppl. 217 (1971) 1-90
- ESELTINE W.P.van, RAHN O.: The effect of temperature upon bacteriostasis. J. Bact. 57 (1949) 547-554
- FASSIN W., HENGEL R., KLEIN P.: Bakteriostase und Bakterizidie als Alternativen des antibakteriellen Chloramphenicol-effektes. Z. Hyg. 141 (1955) 363-375
- GARRETT E.R., MILLER G.H., BROWN M.R.W.: Kinetics and mechanisms of action of antibiotics on micro-organisms V. Chloramphenicol and Tetracycline affected *Escherichia coli* generation rates. J. pharm. Sci. 55 (1966) 593-600
- GEURDEN L.: Einfluß der Temperatur auf die Chemosensibilität von Mycobakterien in vitro und auf ihre Virulenz für Versuchstiere. Pneumonologie 142 (1970) 291-293
- HOBBY G.L., MEYER K., CHAFFEE E.: Observations on the mechanism of action of Penicillin. Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med. 50 (1942) 281-285
- HOBBY G.L., DAWSON M.H.: Effect of rate of growth of bacteria on action of Penicillin. Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med. 56 (1944) 181-184
- HOPPS H.E., WISSEMAN C.L., HAHN F.E., SMADEL J.E., HO R.: Mode of action of Chloramphenicol. IV. Failure of selected natural metabolites to reverse antibiotic action. J. Bact. 72 (1956) 561-567
- HOYT R.E., PRATT O.B., LEVINE M.G.: The activity of Penicillin at temperatures above 37° C. J. Labor. a. clin. Med. 30 (1945) 736-737
- INGRAHAM J.L.: in: GUNSALUS I.C., STANIER R.Y.: The Bacteria. A treatise on structure and function. Vol IV: The physiology of growth. Chapter 7: Temperature relationships. Academic Press, New York-London (1962)

- JOHNSON F.H., EYRING H., POLISSAR M.J.: The kinetic basis of molecular biology. John Wiley & sons inc., New York - Chapman & Hall Ltd., London, (1954)
- JORDAN R.C., JACOBS S.E.: The effect of temperature on the growth of *Bacterium coli* at pH 7,0 with a constant food supply. J. Gen. Microbiol. 1 (1947) 121-136
- JOSLYN D.A.: Scientific apparatus and laboratory methods. Science 99 (1944) 21-22
- KIRBY W.M., ERICSSON H., BARBER M., NAUMANN P., DE SANCTIS-MONALDI T.: Laboratory tests and their applications in the daily practice of antibiotherapy. Antibiot. Chemother. (Basel) 11 (1963) 194-228
- KLEIN P.: Über die beiden Wirkungsdeterminanten des Terramycin. Klin. Wschr. Jg.:31, H.:45/46 (1953) 1087-1091
- KLUDAS M., STÖSS B.: Über die Wirkungssteigerung von Penicillin und Penicillin-Streptomycin durch Temperaturerhöhungen. Z. Hyg. 139 (1954) 216-221
- KNOTHE H., BUTENBERG O.: Zur Frage der Temperaturabhängigkeit von Antibiotica gegenüber gramnegativen Darmbakterien. Z. Hyg. 141 (1955) 315-325
- KNOX R., COLLARD P.: The effect of temperature on the sensitivity of *Bacillus cereus* to Penicillin. J. Gen. Microbiol. 6 (1952) 369-373
- KNOX R., KING M.B., WOODROFFE R.C.: In vitro action of Isoniacid on *Mycobacterium tuberculosis*. Lancet 263 (1952) 854
- KOCH R.: Ueber Desinfection. Mitt. Kaiserlichen Gesundheitsamtes 1 (1881) 234-282
- KOCH W., KAPLAN D.: (Nature 203 (1964) 896) - zitiert nach: OBERZILL (196) S.: 143
- LAMPERT H.: Überwärmung als Heilmittel. Hypokrates - Verlag, Stuttgart (1948)
- LAPORTE A., FRITEL D., RICORDEAU G., BETOURNÉ C.: Le problème des rechutes dans les fièvres typhoïdes et paratyphoïdes. Traitées par la Chloromycétine. Presse méd. 58 (1950) 989-990

- LEE S.W., EPSTEIN J.A., FOLEY E.J.: Temperature and the bacteriostatic action of Sulfathiazol and other drugs. II. Streptococcus pyogenes. Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med. 53 (1943 b) 245-247
- LEE S.W., FOLEY E.J., EPSTEIN J.A., JEANNE A.: Mode of action of Penicillin. I. Bacterial growth and Penicillin activity - Staphylococcus aureus FDA. J. Bact. 48 (1944) 393-399
- LEE S.W., FOLEY E.J.: Effect of temperature on the action of Penicillin in vitro. Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. 60 (1945) 133-136
- MAEKAWA N. et al.: The effect of antituberculosis chemotherapy in vitro under various conditions inadequate for the growth of tubercle bacilli. I. Incubating temperature and chemotherapeutic effect. Kekkaku 46 (1971) 235-237
- MALLETTE M.F.: in: NORRIS J.R., RIBBONS D.W.: Methods in Microbiology. Vol. 1 Academic Press, New York - London (1969)
- MANNHEIM W. (1964): Im Labor W. Mannheim erstellte Standardkurve und Tabelle zur Beziehung zwischen Transmission (578 nm; Blaustichröhrchen von 13mm Ø) und Bakterientrockensubstanz pro Volumen (80° C) bei spätexponentiellen Zellen von Escherichia coli (Nr. 47357/64; Trypticase-Soy-Broth (Zellen gewaschen und resuspendiert in 0,85%-iger NaCl-Lg.; Küvettenhalter 115320 Photometer Eppendorf)) Marburg
- MANNHEIM W., WOLF G.: The temperature requirements of growth of some Mycoplasmas. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 221 (1972) 234-249
- MARKS J.: 'Einfluß von Hyperthermie und antibakteriellen Substanzen auf Tuberkelbacillen'. Brit. Med. J. (1951 II) 1318
- MITCHELL P.: in: WERKMAN, WILSON: Bacterial Physiology. Chapter V: Physical factors affecting growth and death. New York (1951)
- MONOD J.: Recherches sur la croissance des cultures bactériennes. Actualités scientifiques et industrielles. No. 911, Hermann & Cie, Paris (1942)
- MUGGENTHALER H.: Penicillinkur bei einer Endocaditis lenta durch Pyrufer entscheidend beeinflusst. Med. Mschr. 4 (1950) 299

- MUSCHEL L.H., AHL L.A., FISHER M.W.: Sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa* to normal serum and to Polymyxin. J. Bact 98 (1969) 453-457
- OBERZILL W.: Mikrobiologische Analytik. Verlag Hans Carl, Nürnberg (1967)
- PATCHING J.W., ROSE A.H.: in: NORRIS J.R., RIBBONS D.W.: Methods in Microbiology. Vol. 2 Academic Press, New York - London (1970)
- RANTZ L.A., KIRBY W.M.M.: Quantitative studies of Sulfonamide inhibitors. J. of Immun. 48 (1944) 29-36
- SIMON H.: Die Temperaturbedürfnisse des Wachstums der *Acinetobacter*gruppe (eine taxonomische Studie). Inaug. Diss. Marburg (1972)
- STÁRKA J.: Physiologie und Biochemie der Mikroorganismen. Stuttgart (1968)
- THEN R.: Influence of Sulfonamide Antagonists on the synergism of Sulfamethoxazole/Trimethoprim in *Escherichia coli*. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 225 (1973) 34-41
- WEWALKA G., ROTTER M., GREDLER B., ASTER L.: Vergleichende Untersuchungen der Aktivität von Ciclacillin, Ampicillin und Carbenicillin in vitro. Zbl. Bakt. Hyg., Abt. Orig. A 225 (1973) 187-196
- WHITE H.J.: The relationship between temperature and the streptococcal activity of Sulfanilamide and Sulfapyridine in vitro. J. Bact. 38 (1939) 549-561
- WHITE H.J., PARKER J.M.: The bactericidal effect of Sulfonamid upon beta hemolytic Streptococci in vitro. J. Bact. 36 (1938) 481-498
- WINKLER U.: Über die Abhängigkeit der bakteriziden Wirkung von Mitomycin C auf *E.coli* B und B/MC von der Temperatur und dem Nährmedium. Z. Naturforscher 17 b (1962) 670-675

Meine akademischen Lehrer waren die Frauen und
Herrn Professoren und Dozenten:

- in Frankfurt : Dänzen, Egle, Frick, Greven, Hanke,
Heinz, Kretschmann, Lindauer, Müller,
Müser, Ried, Roka, Rosenstock, Royen,
Schmitt-Neuroth, Schneider, Schroeder,
Seubert, Starck, Vossins, Wezler,
Wieland, Zahn.
- in Marburg : Buchholz, Dölle, Gedigk, Hardwig, Krenz,
Pots, Rodeck, Schlosser, Schrappe,
Schwaiger, Siegert, Vogel.
- in Wien : Asperger, Baumgarten, Bruecke, Deutsch,
Flamm, Hruby, Kempny, Klare, Novotny
- in Heidelberg: Bahner, Becker, Bickel, Bleyl, Boenning-
haus, Braun, Brauss, Bräutigam, Christian,
Cotta, Daum, Diesfeld, Diezel, Doerr, Ey,
Frieese, Gaushirt, Gögler, Goertler, Hahn,
Heigl-Evers, Jaeger, Jansen, Juszatz, Kohn,
Komerell, Kraus, Kuhn, Kuhn, Lau, Linder,
Munk, Paeslack, Pape, Pfeifer, Quadbeck,
Reinbach, Rossner, Schettler, Schipperges,
Schmidt, Schnyder, Stenger, Tellenbach,
Trede, Ule, Vollmar, Weber, Wegener,
Weicker, Zander

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die dem Fachbereich Humanmedizin der Universität Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel: Untersuchungen über die Temperaturabhängigkeit der Wirkung antibakterieller Chemotherapeutika in vitro im Hygiene-Institut der Philipps-Universität Marburg (Leitung: Herr Professor Dr. med. R. Siegert) unter Leitung von Herrn Professor Dr. med. W. Mannheim ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende, oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Marburg, den

Lebenslauf

Am 23.1.1944 wurde ich als zweiter Sohn des Studienrates Julius Frassine und dessen Ehefrau Hilde geb. Augustin in Trautenau in Böhmen geboren. Nach der Vertreibung im Winter 1945/46 fanden wir im Februar 1946 Wohnung in Knoden im Odenwald. Von dort übersiedelten wir im Dezember 1953 nach Bensheim a.d. Bergstr., wo ich bis jetzt meinen Wohnsitz habe. Zu Ostern 1950 trat ich in Knoden in die Volksschule ein; von Ostern 1954 an besuchte ich das Alte Kurfürstliche Gymnasium in Bensheim, wo ich dann am 25.2.1964 das Abitur ablegte. Nach einem Jahr Dienst bei der Bundeswehr begann ich im Sommersemester 1965 an der Universität Frankfurt mit dem Medizinstudium. Dort legte ich im September 1967 die ärztliche Vorprüfung ab. Nach je einem Studiensemester in Marburg (SS 1968) und in Wien (WS 1968/69) setzte ich an der Universität Heidelberg mein Studium fort. Am 25.6.1971 legte ich dort die ärztliche Prüfung ab. Während meiner Medizinalassistentenzeit war ich am Kreiskrankenhaus Immenstadt, am Hygiene-Institut der Universität Marburg - hier begann ich unter Anleitung von Herrn Prof.Dr.W.Mannheim diese Dissertationsarbeit indem ich den experimentellen Teil durchführte - und am Kreiskrankenhaus Goslar angestellt. Seit Sommer 1973 arbeite ich nun als Assistentsarzt am Kreiskrankenhaus Füssen.

Werner Frassine

614 Bensheim, Hahnbergweg 6

